

Der Einfluss des onkofetalen Glykoproteins 5T4 auf das CXCL12-System in humanen Tumorzelllinien

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Christian Koch

Geboren am 09.07.1992 in Trier

angefertigt am:

Institut für Anatomie

Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Betreuung durch:

Prof. Dr. rer. biol. hum. Jürgen Engele

Dr. rer. nat. Malte Puchert

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:

17.12.2019

Inhaltsverzeichnis

1 Vorbemerkung	1
2 Bibliographische Beschreibung	1
3 Abkürzungsverzeichnis	3
4 Einführung	5
4.1 Chemokine	5
4.1.1 Allgemeines und Klassifizierung	5
4.1.2 Evolution und Funktion	6
4.1.3 Rezeptoren und Signaltransduktion	7
4.2 Das CXCL12-System	9
4.2.1 Entdeckung und Besonderheiten	9
4.2.2 CXCR4 und CXCR7	9
4.2.3 Die Rolle des CXCL12-Systems in Tumorzellen	12
4.3 Das onkofetale Glykoprotein 5T4	14
4.3.1 Onkofetale Antigene	14
4.3.2 5T4/TPBG	15
4.4 Wissenschaftliche Zielsetzung	17
5 Publikation	18
6 Zusammenfassung	31
7 Ausblick	33
8 Literaturverzeichnis	34
9 Anhang	43
9.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	43
9.2 Erklärung über den wissenschaftlichen Beitrag des Promovenden an der ausgewählten Publikation	44
9.3 Teilnahmebescheinigung: Vorlesung zur guten wissenschaftlichen Praxis an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig	45
9.4 Curriculum vitae	46
9.5 Veröffentlichung im Rahmen dieser Arbeit	47
9.6 Danksagung	47

1 Vorbemerkung

Für diese Dissertationsschrift wurde die Form der Publikationspromotion gewählt. In der eingefügten Originalpublikation werden alle verwendeten Materialien und Methoden sowie die Ergebnisse beschrieben und ausführlich diskutiert.

2 Bibliographische Beschreibung

Christian Koch

Titel der Dissertationsschrift:

Der Einfluss des onkofetalen Glykoproteins 5T4 auf das CXCL12-System in humanen Tumorzelllinien

Universität Leipzig, Publikationspromotion

48 Seiten, 107 Literaturangaben, 1 Publikation

Referat

Das Chemokin CXCL12/SDF-1 vermittelt in Tumorzellen eine Vielzahl von Prozessen, die zentral an der Pathogenese und Pathogenität von Tumorerkrankungen beteiligt sind. Insbesondere steuert CXCL12 maßgeblich Migration, Invasion sowie Angiogenese und Proliferation maligne entarteter Zellen und ist deshalb aussichtsreiche Zielstruktur der individualisierten Tumorthherapie. Bisher nur teilweise verstanden ist dabei bis heute, inwiefern äußere Einflüsse dieses CXCL12-induzierte Verhalten bestimmen und welche genaue Rolle den beiden CXCL12-Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 dabei zukommt. Das onkofetale Glykoprotein 5T4/TPBG wird auf Embryonal- und Tumorzellen exprimiert. 5T4⁺-Tumoren zeichnen sich insbesondere durch eine hohe Tendenz zur frühzeitigen Metastasierung aus und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert. In mehreren Publikationen konnte gezeigt werden, dass die CXCL12-Signaltransduktion wie auch die

Rezeptorexpression und -selektivität in embryonalen Mäusefibroblasten (MEFs) durch 5T4 moduliert wird.

Diese Arbeit geht primär der Frage nach, inwiefern die Koexistenz von 5T4 das CXCL12-vermittelte Signalverhalten in Tumorzellen dirigiert. Dazu wurden das Expressionsmuster und die subzelluläre Lokalisation der beiden CXCL12-Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 in sechs verschiedenen Tumorzelllinien mittels Western-Blot, Immunzytochemie und FACS-Analyse betrachtet. Darauf aufbauend wurden receptorspezifische Antagonisten eingesetzt, um zu eruieren, über welchen der beiden Rezeptoren die CXCL12-Signalweiterleitung vermittelt wird. Als klassische Tumorcharakteristika wurden dabei Migration und Proliferation betrachtet, die mittels Boyden-Chamber-Assay respektive MTT-Assay quantifiziert wurden. Es zeigte sich, dass beide Rezeptoren überwiegend intrazellulär lokalisiert sind und nur in geringem Ausmaß in der Membran vorliegen, wobei in der Mehrzahl der Zelllinien beide Rezeptoren an der Signaltransduktion beteiligt sind. Zur Klärung der Frage, inwiefern 5T4 diese Signalweiterleitung beeinflusst, wurde ein 5T4-spezifischer Knockdown mittels siRNA-Transfektion vorgenommen, um anschließend Rezeptorexpression, Migrationsverhalten und Proliferation erneut zu evaluieren. Insgesamt zeigte sich in der Mehrzahl der Fälle, dass ein Knockdown von 5T4 keinen Einfluss auf die CXCL12-Signaltransduktion hat und das 5T4-assoziierte onkogene Potential vielmehr unabhängig vom CXCL12-System entfaltet wird. Die Etablierung von 5T4 als zuverlässigem Marker für die Organisation des CXCL12-Systems in Tumorzellen erscheint daher nicht vielversprechend.

3 Abkürzungsverzeichnis

ACKR	engl.: atypical chemokine receptor
ADC	engl.: antibody-drug conjugate
AFP	Alpha-Fetoprotein
ALL	Akute lymphatische Leukämie
CAF	engl.: cancer-associated fibroblast
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAR-T	engl.: chimeric antigen receptor T-cell
CD	engl.: cluster of differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CTLA-4	engl.: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAG	Diacylglycerin
EGFR	engl.: epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transformation
ERK	engl.: extracellular-signal regulated kinases
FACS	engl.: fluorescence-activated cell scanning
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	engl.: Guanine nucleotide exchange factor
GPCR	engl.: G protein-coupled receptor
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	engl.: human immunodeficiency virus
IL-1	Interleukin-1
IP ₃	Inositoltrisphosphat
I-TAC	engl.: interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
kDa	Kilodalton

KO	engl.: Knockout
LESTR	engl.: leukocyte-expressed seven transmembrane-domain receptor
LRR	engl.: leucine-rich repeat
MEF	engl.: mouse embryonic fibroblast
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase-2
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
NSCLC	engl.: non-small-cell lung carcinoma
PD-1	engl.: programmed cell death protein 1
RNA	engl.: ribonucleic acid
SCLC	engl.: small-cell lung carcinoma
SDF-1	engl.: stromal cell-derived factor 1
siRNA	engl.: small interfering ribonucleic acid
TAM	engl.: tumor-associated macrophage
TME	engl.: tumor microenvironment
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha
TPBG	Trophoblastäres Glykoprotein
VEGF	engl.: vascular endothelial growth factor

4 Einführung

4.1 Chemokine

4.1.1 Allgemeines und Klassifizierung

Namensgebend für die Gruppe der Chemokine ist ihre Fähigkeit, Zellmigration zu ermöglichen und damit als *chemotaktische Zytokine* zu fungieren (Griffith et al. 2014). Analog zu den übrigen Zytokinen handelt es sich bei Chemokinen um kleine, basische Proteine bzw. Polypeptide mit einer Größe von ca. 8-10 kDa, die über ihre Rezeptoren hormonähnliche Wirkungen an Zielzellen vermitteln (Chen et al. 2018). Klassischerweise ist diese Wirkung zumeist lokal begrenzt, weshalb Zytokine im Gegensatz zu „echten“ Hormonen auch als „Gewebshormone“ bezeichnet werden. Ihre vielfältigen, pleiotropen Effekte werden dabei überwiegend autokrin und parakrin vermittelt, sofern ausreichend hohe Plasmaspiegel erreicht werden auch endokrin.

Die ersten Chemokine, Interleukin-8/CXCL8 und CCL2, wurden im Laufe der 1980er Jahre entdeckt (Yoshimura et al. 1987, Yoshimura et al. 1989) und später zu einer eigenständigen Gruppe zusammengefasst (Oppenheim et al. 1991). Bisher sind ca. 50 verschiedene Chemokine beschrieben, wobei anhand ihrer Struktur vier Klassen unterschieden werden. Ausschlaggebend für diese Einteilung ist die Anordnung von Cystein-Disulfidbrücken am N-terminalen Molekülende. Liegt nur eine solche Bindung vor, handelt es sich um ein C-Chemokin, wohingegen in CC-Chemokinen je eine Disulfidbrücke von direkt benachbarten Cysteinen ausgebildet wird (Miller and Mayo 2017). Befinden sich letztere nicht in unmittelbarer Nachbarschaft, sondern werden durch eine oder drei weitere Aminosäuren voneinander getrennt, so bezeichnet man dieses Molekül wiederum entweder als CXC- oder CX3C-Chemokin (Bachelier et al. 2014). Ausgehend von dieser strukturellen Klassifizierung leitet sich die Nomenklatur für Chemokine vom Chemokin-Subtyp ab und wird gepaart mit dem Buchstaben L für Ligand und einer kontinuierlichen Nummerierung. Lediglich das Interleukin-8/CXCL8 stellt als CXC-Chemokin eine Ausnahme dieser Namensgebung dar, die entdeckungsgeschichtlich in der ursprünglichen Einordnung als Interleukin begründet liegt (Yoshimura 2015).

4.1.2 Evolution und Funktion

Phylogenetisch betrachtet sind Chemokine in allen Vertebraten sowie manchen Bakterien und Viren verbreitet, was ihre evolutionäre Bedeutung unterstreicht (Zlotnik et al. 2006). Das menschliche Genom verfügt über zwei große Chemokincluster auf Chromosom 4 und 17, die verhältnismäßig wenige Sequenzhomologien zur Maus aufweisen und wahrscheinlich evolutionär durch Genduplikation entstanden sind (Zlotnik and Yoshie 2012). Chemokine innerhalb eines Clusters bewirken dabei meist synergistische, inflammatorische Effekte, um eine starke Wirtsantwort zu generieren, was wahrscheinlich einen Selektionsvorteil dargestellt hat. Unterstützend für diese These zeigen viele Clusterchemokine wie auch ihre Rezeptoren keine strenge Rezeptor-respektive Ligandenselektivität und können im Sinne einer Wirkverstärkung redundant agieren (DeVries et al. 2006). Interessanterweise liegt das CXCL12-Gen auf Chromosom 10 und ist somit nicht Bestandteil des großen CXC-Clusters auf Chromosom 4. Obendrein weist es im Gegensatz zu den anderen CXC-Chemokinen eine verblüffend hohe Sequenzhomologie zu anderen Spezies wie Maus oder Zebrafisch auf (Zlotnik et al. 2006) und zeigt neben dieser hochgradigen Konservierung eine hohe Rezeptorselektivität zu seinem Rezeptor CXCR4 und umgekehrt (Puchert and Engele 2014). In Zusammenschau bieten diese Befunde Anhalt dafür, dass CXCL12 im Laufe der Evolution der Chemokine eine Sonderrolle einnimmt und eine selektive und kontrollierte Aktivierung von CXCR4 existentiell wichtig ist.

Alle Chemokine verbindet ihre Fähigkeit, gerichtete Zellmigration (Chemotaxis) zu vermitteln (Wang and Knaut 2014). Aus dieser Eigenschaft begründet sich ihre herausragende Rolle für die Immunantwort und ihr Stellenwert für die Regulierung einer „immunologischen Homöostase“. Zwangsläufig unterscheiden sich die verschiedenen Chemokine dabei in Ihrer Wirkung auf die Immunantwort und gleichwohl bestimmt immer der Gesamtkontext aller Zytokine, ob eine inflammatorische Antwort erfolgt oder ausbleibt (Griffith et al. 2014). Vor diesem Hintergrund leitet sich eine weitere, funktionelle Einteilung in inflammatorische und homöostatische Chemokine ab. Letztere, zu denen auch CXCL12 gezählt wird, werden konstitutiv exprimiert und regulieren vorrangig die basale Leukozytenbewegung und Prozesse des erworbenen Immunsystems wie die Antigenpräsentation (Zlotnik and Yoshie 2012). Inflammatorische Chemokine hingegen sind meist in Clustern organisiert und werden in hohen Konzentrationen als Reaktion auf Entzündung, Infektion oder Trauma sezerniert (Sokol et al. 2015). Freigesetzt durch klassische inflammatorische Zytokine wie IL-1 oder TNF- α , vermitteln

sie im Allgemeinen eine aktive Wanderung vorrangig von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten entlang eines Gradienten, hin zum Ort der höchsten Konzentration. In Anbetracht dieser Zusammenhänge ist ersichtlich, dass eine Fehlregulation des Chemokinsystems eine immense Zahl von Pathologien begünstigt, so zum Beispiel Arteriosklerose oder Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose (Puchert et al. 2017) und Rheumatoide Arthritis (Firestein and McInnes 2017, Charo and Ransohoff 2006).

Entgegen der lange vertretenen Annahme, die Rolle von Chemokinen konzentriere sich ausschließlich auf Immunprozesse, erwiesen sich einige Chemokine als essentiell für die Migration und Entwicklung verschiedener Stammzellen (Kawabata et al. 1999, Doitsidou et al. 2002, Knaut et al. 2003, Wang and Knaut 2014). Im Zuge dieses Paradigmenwechsels wurde klar, dass die Organogenese maßgeblich durch Chemokine, wie bspw. CXCL12, gesteuert wird und entsprechende Gendefekte oft nicht mit dem Leben vereinbar sind (Nagasawa et al. 1996a). Nicht minder bemerkenswert war die Erkenntnis, dass mindestens zwei Chemokinrezeptoren, CCR5 und CXCR4, als Cofaktoren für das Eindringen des humanen Immundefizienzvirus in CD4⁺-Zellen fungieren und ihre Inhibition einen Eintritt des HI-Virus in die T-Zelle verhindern kann (Alkhatib et al. 1996, Bleul et al. 1996, Feng et al. 1996).

4.1.3 Rezeptoren und Signaltransduktion

Chemokine vermitteln ihre Wirkung im Gegensatz zu anderen Zytokinen, wie bspw. Interferonen oder Interleukinen, über G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranrezeptoren (GPCRs). Bisher sind ca. 20 verschiedene Chemokinrezeptoren bekannt (Griffith et al. 2014); analog zur Nomenklatur der Chemokine werden die Rezeptoren nach der Chemokin-Klasse C, CC, CXC oder CX3C benannt und mit dem Buchstaben R für Rezeptor sowie einer Nummer versehen (Bachelier et al. 2014).

Die Signaltransduktion der meisten Chemokinrezeptoren wird über klassische GPCR-Signalwege vermittelt (Griffith et al. 2014). Dabei wird durch Ligandenbindung am extrazellulären N-Terminus eine Konformationsänderung des Rezeptormoleküls induziert. Als Folge dieser Konformationsänderung kann der Rezeptor als GTP-Austauschfaktor (GEF) für das assoziierte G-Protein fungieren und das biologisch inaktive GDP durch das aktive GTP ersetzen (Hilger et al. 2018). Das aktivierte G-Protein zerfällt daraufhin in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Einheit, die sich vom Transmembranrezeptor

lösen können, um weitere intrazelluläre Signalkaskaden in Gang zu setzen. Zu den im Verlauf aktivierten Enzymen gehören insbesondere die Adenylatcyclase sowie die Phospholipase C- β mit ihren jeweiligen klassischen second messengern cAMP bzw. IP₃, DAG und Calcium. Als prominenteste, nachgeschaltete intrazelluläre Signalelemente fungieren die zu den Serin/Threonin-Kinasen gehörenden Akt (Proteinkinase B) und ERK (Wang et al. 2018). Die letzte Konsequenz dieser Signalkette ist meist eine Aktinpolymerisation (Voermans et al. 2001) und Aktivierung bzw. nukleäre Translokation von Transkriptionsfaktoren, um im Zellkern die Genexpression zu regulieren.

Die für die GPCR-Signaltransduktion essentiell wichtige GEF-Funktion wird bei klassischen Chemokinrezeptoren über das sogenannte DRYLAIF-Motiv, eine spezifische Sequenz aus sieben Aminosäuren in der zweiten intrazellulären Rezeptorschleife, vermittelt (Nibbs and Graham 2013). Dieses wiederum ist bei einigen Chemokinrezeptoren modifiziert bzw. fehlt, was dazu führt, dass diese Rezeptoren keine typische GPCR-Signaltransduktion vermitteln können und eine eigene Subgruppe der atypischen Chemokinrezeptoren (ACKRs) bilden (Bonecchi and Graham 2016). Einige ACKRs können durch Internalisierung und Abbau von Chemokinen als Scavenger fungieren, was wiederum für den Aufbau von Gradienten relevant ist. Unabhängig davon sind ACKRs auch zu aktiver Signaltransduktion in der Lage, wobei insbesondere dem GPCR-regulierenden Protein β -Arrestin oft eine entscheidende Rolle zukommt (Rajagopal et al. 2010, Ma and Pei 2007). Bis heute werden fünf der 23 beschriebenen Chemokinrezeptoren den ACKRs zugeordnet, darunter auch der CXCL12-Rezeptor CXCR7 (Bachelier et al. 2014).

4.2 Das CXCL12-System

4.2.1 Entdeckung und Besonderheiten

Auf der Suche nach Faktoren, die das B-Zell-Wachstum im Knochenmark stimulieren, wurde CXCL12 im Laufe der 1990er Jahre erstmals durch Nagasawa et al. (1994) beschrieben. Das identifizierte Molekül nannten sie entsprechend ihrer Befunde pre-B-Cell growth-stimulating factor, bevor es kurz darauf als stromal cell-derived factor 1 bzw. CXCL12 klassifiziert wurde. Galten Chemokine bis dahin primär als inflammatorische Mediatoren, war dieser Befund durchaus erstaunlich und ließ Fragen nach weiteren Funktionen aufkommen (Nagasawa 2015). Im Verlauf konnte gezeigt werden, dass CXCL12 neben der B-Zell-Reifung fundamental in die Embryogenese und Organbildung involviert ist. So versterben CXCL12-KO-Mäuse perinatal und weisen dabei gravierende Fehlbildungen des kardiovaskulären Systems (Nagasawa et al. 1996a, Tachibana et al. 1998), des Knochenmarks (Nagasawa et al. 1996a) und des Hirns auf (Zou et al. 1998). Von den verschiedenen CXCL12-Splicevarianten ist bis heute das aus 68 Aminosäuren bestehende und 8 kDa schwere CXCL12- α am bedeutsamsten (Janowski 2009). Der HIV-Cofaktor LESTR/Fusin wurde als zugehöriger Rezeptor identifiziert und anschließend als CXCR4 der Nomenklatur für Chemokinrezeptoren zugeordnet (Bleul et al. 1996, Nagasawa et al. 1996b, Oberlin et al. 1996).

4.2.2 CXCR4 und CXCR7

CXCR4 ist ein klassischer Chemokinrezeptor, der seine Wirkungen wie Migration, Proliferation und Angiogenese über konventionelle GPCR-Signalwege wie ERK und Akt vermittelt (Puchert and Engele 2014). Dabei wird CXCR4 im Gegensatz zu vielen anderen Chemokinrezeptoren auf einem breiten Spektrum an Körperzellen exprimiert und vermittelt neben den bereits beschriebenen Funktionen auch die Regeneration von Geweben aus Stammzellen. So konnte gezeigt werden, dass CXCR4 bei Muskeltraining stärker exprimiert wird und die CXCL12-CXCR4-Achse an Muskelregeneration und -wachstum im adulten (Puchert et al. 2016) sowie der Rekrutierung von Myoblasten im embryonalen Organismus beteiligt ist (Hunger et al. 2012, Masyuk and Brand-Saberi 2015). Auch die Verankerung von hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark durch CXCR4 spielt eine große physiologische Rolle und wird sich in der Hämatologie therapeutisch zunutze gemacht. So ist der in dieser Arbeit verwendete CXCR4-Antagonist AMD3100 (Handelsname Mozobil[®]) als Medikament für die

Stammzellmobilisierung vor autologer Stammzelltransplantation zugelassen (Hopman and DiPersio 2014, Cooper et al. 2016).

Nachdem CXCR4 fast ein ganzes Jahrzehnt als einziger CXCL12-Rezeptor galt, konnte erstaunlicherweise gezeigt werden, dass ein weiterer HIV-Corezeptor CXCL12 mit höherer Affinität binden kann als CXCR4 (Balabanian et al. 2005). Aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften wurde dieser neue Rezeptor namens RDC1/CXCR7 den ACKRs zugeordnet und es stellte sich heraus, dass CXCR7 gleichzeitig von CXCL-11/I-TAC gebunden werden kann (Burns et al. 2006). Die wesentliche physiologische Funktion von CXCR7 besteht dabei in der Sequestrierung von extrazellulärem CXCL12, um einen Gradienten aufzubauen, entlang dessen sich eine gerichtete CXCR4-vermittelte Migration vollziehen kann (Puchert and Engele 2014). Rajagopal et al. (2010) konnten zeigen, dass CXCR7 auch in der Lage ist, eine ERK-Aktivierung über β -Arrestin zu vermitteln. Seitdem wurde durch eine Vielzahl an Publikationen deutlich, dass CXCR7 nicht bloß als reiner Decoy-Rezeptor betrachtet werden darf und es konnte erstmals in unserer Arbeitsgruppe demonstriert werden, dass sogar aktive G-Protein-Signaltransduktion in Astrozyten durch CXCR7 vermittelt wird (Odemis et al. 2012). Einhergehend damit unterliegt auch die Betrachtung von CXCR7 als krankheitsförderndem Faktor zunehmend einem Perspektivwechsel. So gibt es immer stärker wachsende Evidenz für eine zentrale, aktive Beteiligung von CXCR7 an Pathologien wie Multipler Sklerose (Puchert et al. 2017), Krebserkrankungen oder Infektionskrankheiten wie dem hämolytisch-urämischem Syndrom (Petruzziello-Pellegrini et al. 2012).

Das Verständnis über die CXCL12-Signaltransduktion unterliegt seit geraumer Zeit einem Wandel und die zunehmende Komplexität des CXCL12-Systems begründet sich vor allem daraus, dass die Signaltransduktion von CXCR4 und CXCR7 sehr heterogen organisiert sein kann. Neben den bisher beschriebenen Mechanismen besteht eine weitere Option in der Heterodimerisierung von CXCR4 und CXCR7, um eine aktive Signaleinheit zu bilden (Lipfert et al. 2013, Levoye et al. 2009, Luker et al. 2009). Ebenso wurden auch ‚downstream crosstalks‘ der Rezeptoren untereinander (Hartmann et al. 2008) oder mit anderen Signalwegen, wie bspw. dem CXCL11/I-TAC-System beschrieben (Singh et al. 2013). Welche Umstände die verschiedenen Formen der CXCL12-Signaltransduktion bedingen, ist dabei noch weitgehend unklar. Offenkundig ist jedoch, dass das jahrelang geltende Diktum einer sich ausschließlich über die CXCR4-

Achse vollziehenden aktiven CXCL12-Signaltransduktion stark vereinfacht war und durch ein komplexeres Modell ersetzt werden muss (siehe Abb.1).

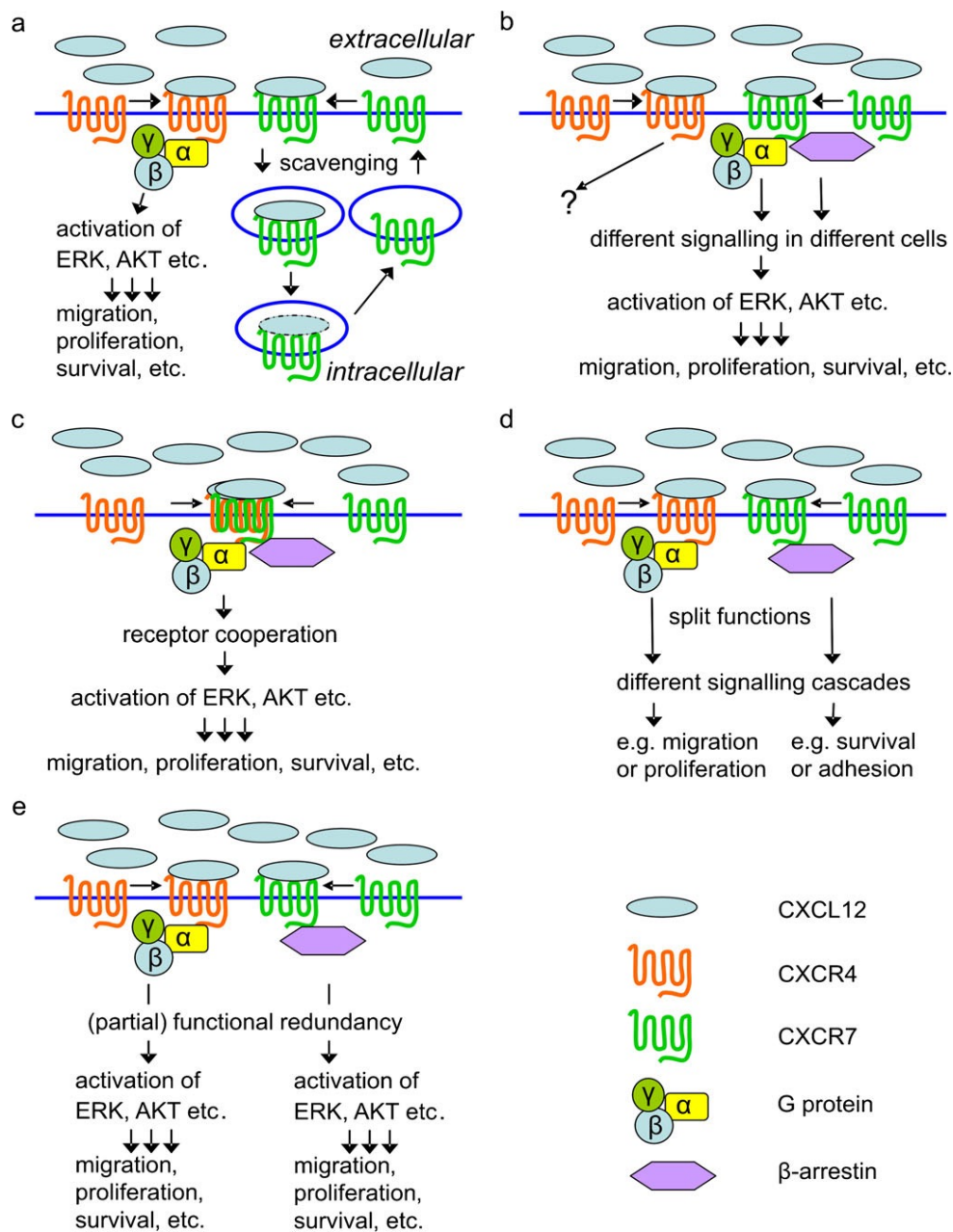


Abbildung 1:

Aus Puchert et al. (2014): Schematisches Modell verschiedener Formen der CXCL12-Signalverarbeitung. Weit verbreitet ist die aktive Signaltransduktion über CXCR4 (a), einhergehend mit einer Decoy-Funktion des Rezeptors CXCR7. CXCR7 kann ebenso als einziger Rezeptor aktiv operieren (b) oder als Heterodimer mit CXCR4 vorliegen (c). Auch eine simultane Signaltransduktion mit divergenten (d) oder synergistischen Effekten (e) ist möglich.

4.2.3 Die Rolle des CXCL12-Systems in Tumorzellen

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass mehr als 23 humane Krebsarten CXCR4 exprimieren (Chatterjee et al. 2014) und eine hohe Expression von CXCL12 die Prognose von Tumorerkrankungen signifikant reduziert (Poppo et al. 2012). Neuere Metastudien können diese Korrelation bestätigen (Samarendra et al. 2017) und ein in den letzten Jahren rapide wachsender Fundus an Literatur versucht dabei, die Rolle von CXCL12 genauer zu beleuchten. In Kongruenz zu den physiologischen Funktionen zeigen CXCL12-exprimierende Tumoren eine höhere Tendenz zur Metastasierung wie auch stärkeres Tumorwachstum und Angiogenese (Puchert and Engele 2014). In Mammakarzinomzellen führt eine CXCR4-Überexpression zu einer erhöhten Inzidenz von Knochenmetasten (Shi et al. 2014) und durch murine *in-vivo*-Modelle konnte demonstriert werden, dass eine gezielte Inhibition von CXCR4 in der Lage ist, diesen Prozess zu unterbinden (Lefort et al. 2017, Liang et al. 2005). Als Metastasierungsorte stehen dabei Organe und Gewebe im Vordergrund, die über eine hohe endogene CXCL12-Synthese verfügen, darunter vorrangig Knochen, Lunge, Leber und Lymphknoten (Zlotnik et al. 2011). In Ovarial- und Magenkarzinomzellen zeigte sich, dass CXCR4 Proliferation und antiapoptotisches Verhalten fördert und dabei entweder direkt über Phosphorylierung von ERK und Akt oder über crosstalk mit dem für die Tumorphiliferation herausragend wichtigen epidermal growth factor receptor (EGFR) agiert (Cheng et al. 2017, Porcile et al. 2005). Die Angiogenese via CXCR4 ist über verschiedene Wege beschrieben. Beinahe allen gemein ist die vermehrte Expression von Angiogenesefaktoren wie VEGF und oftmals kommt es zur Rekrutierung endothelialer CXCR4⁺-Progenitorzellen (Meng et al. 2018, Thomas et al. 2008). Ähnliche Zusammenhänge von CXCL12-CXCR4-Achse und Tumorverhalten konnten für Zellen des Pankreaskarzinoms (Shakir et al. 2015, Chow et al. 2014), des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) (Nagarsheth et al. 2017, Gangadhar et al. 2010), des Prostatakarzinoms (Saha et al. 2017, Chen et al. 2015) sowie für viele weitere maligne Tumoren gezeigt werden.

Obwohl die Einbeziehung von CXCR4 in die Tumorgenese immer besser verstanden scheint, wird die Rolle von CXCR7 in Tumorzellen noch kontrovers diskutiert. In Kontrast zu seinem limitierten Vorkommen auf Körperzellen wird CXCR7 von vielen Tumoren exprimiert und häufig ist eine aktive Signaltransduktion beschrieben, was diametral der physiologischen Rolle zumeist als Scavenger-Rezeptor entgegensteht. In Prostata- wie auch Mammakarzinomzellen fördert CXCR7 Tumorzellproliferation

entweder über ERK-/Akt-Phosphorylierung oder über eine Heterodimerisierung und Modulation des EGFR (Salazar et al. 2014, Singh and Lokeshwar 2011, Wang et al. 2008). Auch eine Verstärkung des Metastasierungsverhaltens in Mamma- und Lungenkarzinomzellen durch CXCR7 wurde mehrfach beschrieben. Hernandez et al. (2011) konnten hingegen demonstrieren, dass eine Überexpression von CXCR7 in Mammakarzinomzellen zu einer Inhibition der CXCR4-gesteuerten Tumorzellinvasion führt und Mausmodelle mit CXCR7-depletierten Endothelzellen zeigen eine deutlich höhere Metastasierungsrate bei gleichzeitig erhöhtem CXCL12-Plasmaspiegel (Stacer et al. 2016). Diese durchaus gegensätzlichen Ergebnisse suggerieren eine höhere Komplexität und Vielfalt der CXCL12-CXCR7-Achse in Tumorzellen als es für die CXCL12-CXCR4-Achse der Fall ist. Welche Kontextfaktoren bestimmen, ob und inwiefern CXCR7 pro- oder antionkogene Wirkungen entfaltet, bleibt eine offene Frage, die näherer wissenschaftlicher Betrachtung bedarf.

Neben den direkt vermittelten Effekten auf die Tumorzellen selbst rückt seit einigen Jahren der Einfluss von CXCL12 auf das Tumormikromilieu (TME) immer mehr in den Vordergrund. So konnten zahlreiche Arbeiten zeigen, dass insbesondere tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) und krebsassoziierte Fibroblasten (CAFs) über CXCL12 autokrin und parakrin kommunizieren (Guo et al. 2016, Orimo et al. 2005). Ein in den letzten Jahren immer besser verstandener Schlüsselmechanismus besteht darin, das TME auf Anergie zu konditionieren und dabei eine „immunologische Nische“ zu schaffen. So werden in Herden des Multiplen Myeloms CXCR4⁺-Monozyten aus der Umgebung rekrutiert und differenzieren innerhalb des TME zu antiinflammatorischen M2-TAMs, um wiederum eine gezielte Immunantwort gegen Tumorzellen zu unterbinden (Beider et al. 2014). Ergänzend dazu konnten Feig et al. (2013) zeigen, dass die gezielte Inhibition von CXCR4 in CAFs die Immunantwort in Pankreaskarzinomen deutlich verbessert. Eine daraus folgende, vielversprechende Therapieoption der Zukunft könnte vor allem in der gezielten Unterbindung dieses immunevasiven Tumorphänotyps liegen und als Kombination mit Immuntherapeutika wie CTLA-4- oder PD-1-Inhibitoren eingesetzt werden (Sharma and Allison 2015).

4.3 Das onkofetale Glykoprotein 5T4

4.3.1 Onkofetale Antigene

Onkofetale Antigene sind Proteine, die im Sinne einer *Conditio sine qua non* ausschließlich auf fetalen und malignen Zellen in nennenswertem Ausmaß exprimiert werden (Stern et al. 2014). Zu ihren bekanntesten Vertretern zählen das Alpha-1-Fetoprotein (AFP) sowie das Carcinoembryonale Antigen (CEA). AFP wird von embryonalen Dottersackzellen exprimiert (Terentiev et al. 2013, Newby et al. 2005) und spielt in der Pränatadiagnostik von Neuralrohrdefekten eine elementare Rolle, aber auch bei Trisomie 21 oder Bauchwandverschlussdefekten wird es als wichtiger diagnostischer Parameter bestimmt (Schieving et al. 2014). Seinen klinischen Einsatz als Tumormarker findet AFP insbesondere beim hepatozellulären Karzinom, ferner auch bei Embryonalzell- und Dottersacktumoren von Ovar und Hoden (Murray et al. 2016). Das seit 1965 bekannte CEA ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe von Glykoproteinen, die an der Adhäsion fetaler Darmzellen involviert sind und als Tumormarker u.a. in der Verlaufsbeurteilung des kolorektalen Karzinoms als Goldstandard verwendet werden (Gold and Freedman 1965, Saito et al. 2016).

Die pathophysiologische Rolle der onkofetalen Antigene wird bis heute kontrovers diskutiert. Bedeutsam für die erfolgreiche Implantation und Koexistenz des Embryos sind zweifelsohne Prozesse, die auch Charakteristika der Malignität darstellen können und wahrscheinlich durch onkofetale Antigene befördert werden (Stern et al. 2014). Dazu gehören vor allem Migration und Invasion wie auch die immunologische Toleranz gegenüber dem Fetus als semi-Allograft im mütterlichen Körper. Die Initiierung solcher fundamentalen biologischen Entwicklungsprogramme in Krebszellen steht eng in Verbindung mit dem Konzept pluripotenter Tumorzellsubpopulationen, den sogenannten Tumorstammzellen, die seit Jahren im Fokus der onkologischen Forschung stehen (Shibue and Weinberg 2017, Brabletz 2012).

Neben ihrem diagnostischen Nutzen bieten die onkofetalen Antigene eine nahezu ideale Angriffsfläche für die Immunonkologie, da sie im adulten Organismus quasi ausschließlich von Tumorzellen exprimiert werden und außerdem auf der Zelloberfläche vorkommen (Stern and Harrop 2017). Krebsimpfstoffe aber auch antibody-drug-conjugates (ADCs) gegen CEA und AFP befinden sich seit Jahren in klinischer Erprobung und zeigen teilweise eine deutliche Verbesserung des progressionsfreien

Überlebens wie auch der 5-Jahres-Überlebensrate bei verhältnismäßig moderaten Arzneimittelnebenwirkungen (Turriziani et al. 2012, Morse et al. 2013).

4.3.2 5T4/TPBG

Auf der Suche nach gemeinsamen Antigenen zwischen Plazentagewebe und Tumoren wurde das Trophoblastäre Glykoprotein 5T4/TPBG von Hole et al. (1988) erstmals beschrieben. Die 5T4-exprimierenden Trophoblastzellen sind für die Ontogenese existentiell wichtig, da sie die Einnistung der Blastozyste in das mütterliche Schleimhautepithel, die Nährstoffversorgung über die Blut-Plazenta-Schranke sowie die immunologische Toleranz gegenüber dem Embryo steuern. Die Verwandtschaft dieser biologischen Programme mit den für die Tumorentwicklung wichtigen Prozessen lässt eine Einbeziehung der onkofetalen Antigene wie 5T4 in die Tumorprogression naheliegend erscheinen (Stern and Harrop 2017).

Es handelt sich bei 5T4 um ein 72 kDa großes Protein mit starker N-Glykosylierung, dessen Gen sich auf dem langen Arm von Chromosom 6 befindet (Boyle et al. 1990). Es verfügt über mehrere Leucin-rich-repeats (LRRs), ein Strukturmotiv, das über Bildung einer Proteindomäne für Protein-Protein-Interaktionen prädestiniert (Bella et al. 2008). Über diese LRRs kann 5T4 bspw. als Inhibitor des kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalweges agieren und dabei den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren, der für die Regulation der Zellmorphologie von Bedeutung ist (Zhao et al. 2014, Kagermeier-Schenk et al. 2011). Stern et al. konnten zeigen, dass die Anwesenheit von 5T4 als früher Marker der Stammzelldifferenzierung hin zu mesenchymalem Charakter exprimiert wird und mit den nukleären Transkriptionsfaktoren Slug und Snail assoziiert ist (Alam et al. 2018). Analog hierzu führt eine Überexpression von 5T4 in Tumorzellen zu einem E- zu N-Cadherin-Switch, gepaart mit einer veränderten Zellmorphologie und Freisetzung der Matrix-Metalloproteinasen MMP-2/MMP-9 (Boyle et al. 1990, Spencer et al. 2007). All diese Vorkommnisse gelten als charakteristische Schritte der epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT), einem existentiell wichtigen und unter physiologischen Bedingungen strengstens regulierten Programm der Entwicklung (Hanahan and Weinberg 2000). So akquirieren Trophoblastzellen nach Durchlaufen der EMT die Fähigkeit, sich aus dem Zellverbund zu lösen und in das mütterliche Gewebe einzuwandern (Alam et al. 2018). Durch Tumorzellen unkontrolliert reaktiviert, gilt die EMT als das entscheidende und prognosebestimmende Ereignis in der Tumorevolution hin zu einem invasiv-metastatischen Phänotyp (Hanahan and Weinberg 2011).

Stern et al. konnten zeigen, dass in embryonalen Mäusefibroblasten 5T4 die CXCL12-Signaltransduktion dahingehend bestimmt, dass 5T4⁺-MEFs zu einer ERK-/Akt-vermittelten Migration via CXCR4 neigen. 5T4⁻-MEFs hingegen exprimieren CXCR7 und zeigen eine Proliferationssteigerung anstelle von Migration (McGinn et al. 2012). Interessanterweise vollzog sich auch die Signaltransduktion nicht über eine bei CXCR4 beobachtete schnelle ERK-/Akt-Phosphorylierung, sondern trat verspätet ein und bezog eine Transaktivierung des EGFR und der Src-Kinase mit ein. Aufgrund ihrer Beobachtungen in MEFs und SCLC-Zelllinien formulierten Stern et al. die Hypothese, dass 5T4 als genereller Marker des CXCL12-Systems fungiert und die stärkere Metastasierung von 5T4⁺-Tumorzellen durch CXCR4 vermittelt wird, wohingegen 5T4⁻-Tumorzellen zu Proliferation durch CXCR7 tendieren.

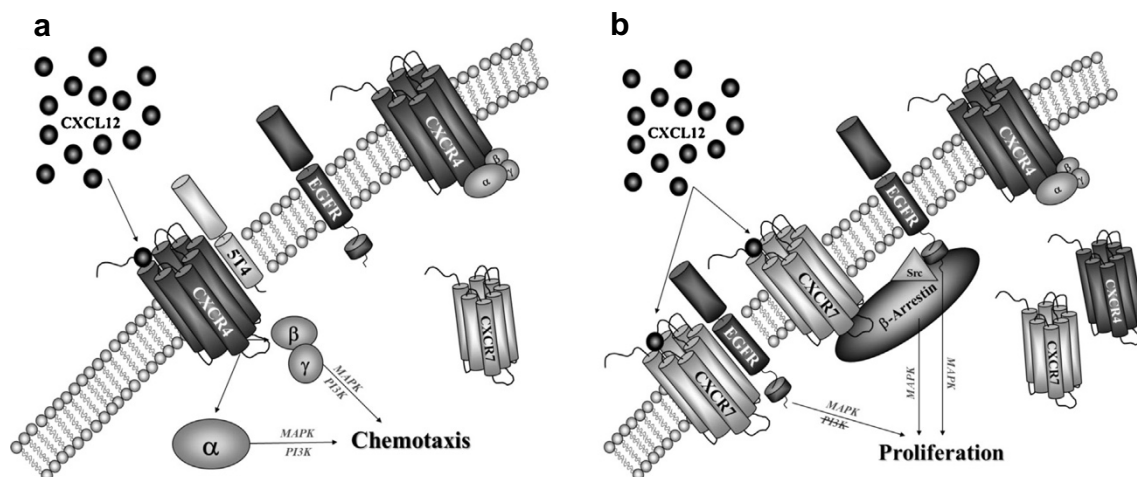


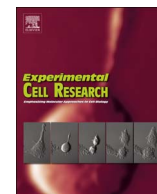
Abbildung 2: Aus Stern et al. (2014): Bisheriges Modell der Interaktion zwischen 5T4 und CXCL12 in MEFs und SCLC-Zellen. In Anwesenheit von 5T4 vermittelt CXCL12 präferentiell Migration via CXCR4, während CXCR7 nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird (a). In 5T4⁻-Zellen hingegen ist CXCR7 in der Membran lokalisiert und vermittelt Proliferation über eine Transaktivierung des EGFR und die Src-Kinase, wohingegen CXCR4 nicht in die aktive Signaltransduktion einbezogen wird (b).

Abgesehen von seiner klinischen Bedeutung als Prognosemarker maligner Erkrankungen konnten klinische Studien zeigen, dass Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom von einer Tumorstimulation mit 5T4 sowohl im Gesamt- wie auch im

progressionsfreien Überleben profitierten (Scurr et al. 2017). Auch ADCs gegen 5T4 zeigen vielversprechende Erfolge in ALL-Mausmodellen (McGinn et al. 2017, Castro et al. 2012) und ebenso wurde der 5T4-Antikörper Naptumomab estafenatox erfolgreich in Patienten mit Nierenzellkarzinom getestet (Hawkins et al. 2016). Ein neuer und vielversprechender Ansatz der Tumorthherapie besteht in der gentechnischen Bearbeitung von humanen T-Zellen (CAR-Ts), die eine gezielte Immunantwort gegen Tumorzellen induzieren. 5T4-CAR-Ts konnten in aktuellen Studien eine klare Reduzierung der Tumorlast bewirken und zeigen ein enormes Potential, in der Tumorthherapie der Zukunft Anwendung zu finden (Guo et al. 2017, Owens et al. 2018).

4.4 Wissenschaftliche Zielsetzung

Das CXCL12-System mit seinen Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 ist zentral in die Tumorgenese involviert und es tritt immer deutlicher zutage, dass dieses System hochkomplex und heterogen organisiert ist. Die Etablierung geeigneter Marker für die individuelle Organisation des CXCL12-Systems in Tumorzellen kann in Zukunft wesentlich für die Entwicklung therapeutischer Ansätze sein. Diese Arbeit soll zu einem besseren Verständnis über den Einfluss von 5T4 auf humane Tumorzelllinien und deren CXCL12-System beitragen und gleichzeitig prüfen, inwiefern 5T4 als verlässlicher und valider Indikator für die Organisation des CXCL12-Systems in Tumorzellen gelten kann. Dazu wurde in den Tumorzelllinien A549 (nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)), C-33A (Zervixkarzinom), DLD-1 (Kolorektales Karzinom), MDA-MB-231 (Mammakarzinom), PC-3 (Prostatakarzinom) sowie H4 (Neurogliom) die CXCL12-Rezeptorexpression analysiert. Die Parameter Migration und Proliferation wurden anschließend unter Verwendung der Rezeptorspezifischen Antagonisten AMD3100 und CCX771 untersucht. Insbesondere die Frage, ob 5T4 die Expression und Lokalisation von CXCR4 und CXCR7 wie auch deren Signaltransduktion beeinflusst, sollte durch spezifischen Knockdown von 5T4 mittels RNA-Interferenz geprüft werden.



The 5T4 oncofetal glycoprotein does not act as a general organizer of the CXCL12 system in cancer cells

Malte Puchert¹, Christian Koch¹, Jürgen Engele*

Institute of Anatomy, Medical Faculty, University of Leipzig, Liebigstr. 13, 04103 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

5T4
CXCR4
CXCR7
CXCL12
Chemotaxis
Cell proliferation

ABSTRACT

The chemokine, CXCL12, promotes cancer growth and metastasis through interaction with either CXCR4 and/or CXCR7. This tumor-specific organization of the CXCL12 system obscures current therapeutic approaches, aiming at the selective inactivation of CXCL12 receptors. Since it has been previously suggested that the cellular use of CXCR4 or CXCR7 is dictated by the 5T4 oncofetal glycoprotein, we have now tested whether 5T4 would represent a general and reliable marker for the organization of the CXCL12 system in cancer cells. The CXCR4 antagonist, AMD3100, as well as the CXCR7 antagonist, CCX771, demonstrated that the cancer cell lines A549, C33A, DLD-1, MDA-231, and PC-3 use either CXCR7 and/or CXCR4 for mediating CXCL12-induced chemotaxis and cell proliferation. The use of CXCL12 receptors as well as their subcellular localization remained unchanged in most cell lines following siRNA-mediated depletion of 5T4. In distinct cell lines, inhibition of 5T4 expression, however, modulated tumor cell migration and proliferation *per se*. Collectively our analyses fail to demonstrate general organizational influences of 5T4 of the CXCL12 system in different cancer cell lines, and, hence, dismiss its future use as a diagnostic marker.

1. Introduction

The chemokine, CXCL12, promotes growth and metastasis of tumors from different organs, such as breast, prostate, ovary, lung, gastrointestinal tract, brain, blood, and kidney [1,2]. Depending on the type of tumor and/or patient these effects are either mediated by CXCR4 and/or CXCR7/atypical chemokine receptor 3 (ACKR3) [2]. Consequently, delineation of the heterogeneous organization of the CXCL12 system in individual tumors may play a key role in guidance of future therapeutic strategies using CXCL12 receptor antagonists/inhibitors.

The 5T4 oncofetal glycoprotein (trophoblast glycoprotein, TPBG) is a highly glycosylated transmembrane protein which belongs to the leucine-rich repeat (LRR) protein family and affects cell adhesion, mobility, and cytoskeletal organization [3]. 5T4 is sparsely expressed in normal adult tissue, but present in most tumors [3,4]. By using murine embryonic fibroblasts and small cell lung carcinoma cell lines a previous study suggested that cell surface expression of 5T4 would mark the use of CXCR4, whereas CXCL12 signaling would occur through CXCR7 in its absence [5].

We now asked whether 5T4 represents a general and reliable marker for the organization of the CXCL12 system in tumor cells. To this end, we defined the involvement of CXCR4 and/or CXCR7 in

CXCL12 signaling in various cancer cell lines and determined how this relates to cellular 5T4 expression. In addition, we investigated how inhibition of 5T4 expression would affect the use of CXCL12 receptors in these cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures

The human lung adenocarcinoma cell line, A549, the human cervical cancer cell line, C33A, the human colorectal adenocarcinoma cell line, DLD-1, the human breast adenocarcinoma cell line, MDA-MB-231 (MDA-231), the human neuroglioma cell line, H4, and the human prostate adenocarcinoma cell line, PC-3, were obtained from ATCC and maintained in either Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (4.5 g/l glucose; LONZA; Verviers, Belgium; C33A, MDA-231, H4, PC-3) or RPMI 1640 (Life Technologies; Carlsbad, CA; A549, DLD-1). Media were supplemented with 0.05% Gentamycin (Life Technologies) and 10% fetal bovine serum (Life Technologies). Cells were plated on 10 cm culture dishes (TPP, Sigma, Munich, Germany), subconfluent cultures were used for experiments. In selected experiments, cells were seeded on culture plates previously coated with poly-L-ornithine (Sigma).

* Corresponding author.

E-mail address: engj@medizin.uni-leipzig.de (J. Engele).

¹ These authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.02.001>

Received 12 October 2017; Received in revised form 31 January 2018; Accepted 1 February 2018
0014-4827/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

2.2. Immunological methods

Western blot (WB) analysis and immunofluorescence (IF) staining of cultured cells were performed as previously described [6,7] using the following primary antibodies: goat anti-CXCR4 (ab1670, Abcam, WB, 1:1000; IF, 1:100); rabbit anti-CXCR7 (AP17961PU-N, Acris, WB, 1:300; IF, 1:100; ab138509, Abcam, WB, 1:1000); rabbit anti-5T4 (ab129058, Abcam, WB, 1:1000). Protein loading was controlled by additionally staining blots with anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies (10R-G109A, Fitzgerald, 1:5000). Cell nuclei in immunostained cell cultures were visualized with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; AAT Bioquest, Sunnyvale, CA) and inspected on a Zeiss confocal laser scan microscope (LSM).

2.3. RNA interference

Pre-designed human 5T4 (SI03194478, SI104192811) and negative control (SI03194478) siRNAs were purchased from Qiagen (Hilden, Germany). Transfection was performed in the presence of serum-free medium using either the siPORT™ Amine Transfection Agent (Ambion, Huntingdon, UK) or the Viromer Blue Transfection Agent (Lipocalyx, Halle, Germany). Cells were taken into experiment 24–48 h after transfection. Success of RNA interference was validated by Western blotting.

2.4. Chemotaxis

The chemotactic response of cancer cells to CXCL12 (Almac, East Lothian, Scotland) was evaluated using a modified 48-well Boyden chamber (Neuro Probe, Cabin John, MD), as previously described [7]. One hour prior to analysis, cultured cells were treated with one of the following substances: AMD3100, a selective antagonist for CXCR4 (10 μ M; Sigma, dissolved in double-distilled water), CCX771, a selective antagonist for CXCR7 (100 nM; ChemoCentryx; Mountain View, CA), dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) or CCX704, a compound chemically similar to CCX771, which however does not bind CXCR7 (100 nM; ChemoCentryx; dissolved in DMSO). Migration index was defined as the ratio of cells migrating in the presence and absence of chemokines.

2.5. MTT assay

Cells were seeded into 96-well plates at a density of 5000 cells/well, cultivated overnight at 37 °C, and transfected with siRNA. 24 h after transfection cells were treated with CXCL12 (100 ng/ml); AMD3100 (10 μ M), CCX771 (100 nM) or CCX704 (100 nM) for 48 h alone or in combination as specified. Treatment was repeated daily. Cell numbers were assessed using the Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit according to the manufacturer's recommendations. Cell proliferation occurring in untreated controls was set to 1.

2.6. Statistics

Data, obtained from at least three experiments, are given as mean \pm SD. One way analysis of variance (ANOVA) followed by pairwise multiple comparison procedures (Tukey post-hoc test) or two-tailed Student's *t*-test was used for statistical analysis as appropriate. Differences with *p* < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Analysis of cancer cell lines for expression of 5T4 and CXCL12 receptors

In the cancer cell lines, A549, C33A, DLD-1, MDA-231, and PC-3, 5T4 expression was readily detectable by Western blot analysis with

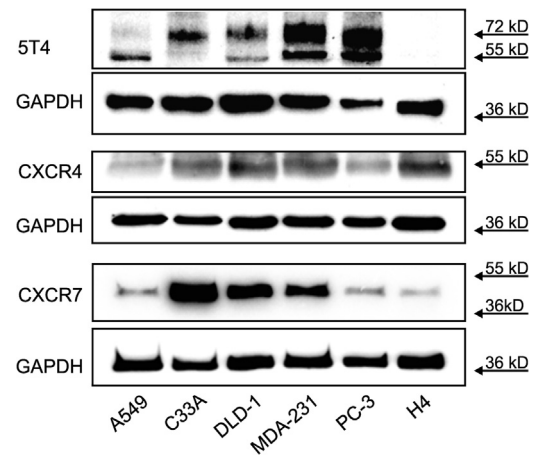


Fig. 1. Expression of 5T4 and CXCL12 receptors by tumor cell lines. Western blot analysis demonstrated the presence of 5T4 in all tumor cell lines, except H4 cells. In addition, all tumor cell lines expressed CXCR4 and CXCR7. GAPDH served as loading control.

highest expression levels in MDA-231 and PC-3 cells (Fig. 1). The only exception was the cell line, H4, which completely lacked 5T4 and was subsequently omitted from all further experiments. Notably, the 5T4 antibody detected two immunoreactive protein bands (approximately 72 kDa and 55 kDa), which both decreased following transfection of the cells with selective 5T4 siRNAs (see Fig. 6, Suppl. Fig. 1). In addition to 5T4, all cancer cell lines expressed CXCR4 and CXCR7 to detectable levels (Fig. 1).

3.2. Heterogeneous organization of the CXCL12 system in tumor cell lines

Since previous studies suggested that CXCL12 signals either through CXCR4 and/or CXCR7 in different tumor cells [2] and/or differentially controls cell functions through these receptors [1,8–10], we analyzed the contribution of CXCR4 and CXCR7 to CXCL12-dependent chemotaxis and cell proliferation of the various tumor cell lines. To this end, we determined the respective cellular responses to CXCL12 in the presence of either the specific CXCR4 antagonist, AMD3100, the specific CXCR7 antagonist, CCX771, or the CCX771 control peptide, CCX704. We routinely used CXCL12 at 100 ng/ml, a concentration previously shown to induce maximal cellular responses [6,11]. All tumor cell lines potentially migrated towards CXCL12 in a modified Boyden chamber, as evidenced by a 2- to 4-fold increase of their migration index (Fig. 2). The CXCL12-dependent chemotactic responses of C33A, MDA-231, and PC-3 cells were likewise attenuated by AMD3100 and CCX771, but not by CCX704 (Fig. 2). The chemotactic responses of A549 and DLD-1 cells to CXCL12 were only attenuated by CCX771, whereas AMD3100 had no statistically significant effects (Fig. 2). In DLD-1 cells, CCX704 also reduced CXCL12-dependent chemotaxis although to a much smaller extent than CCX771 (Fig. 2). This effect is most likely due to DMSO, which served as a solvent. Indeed, a similar decline of CXCL12-induced chemotaxis occurred when DLD-1 cells were treated with DMSO alone (data not shown).

MTT assay demonstrated increased numbers of C33A, MDA-231, and PC-3 cells following treatment with CXCL12 (100 ng/ml) for 48 h (Fig. 3). Higher concentrations of the chemokine (\geq 300 ng/ml) produced either smaller or no increases in cell numbers (Fig. 3). Irrespective of the concentration, CXCL12 failed to affect numbers of A549 and DLD-1 cells (Fig. 3). The same applied when these cells were assayed on coated culture plates (data not shown). We consequently suggest that the absence of CXCL12-dependent increases in A549 and DLD-1 cell numbers is rather due to already maximal cell proliferation under control conditions than to the CXCL12-induced loss or decline of cell adhesion and the subsequent detachment of cells from the culture plate. Comparable to our findings from chemotaxis, CXCL12-induced

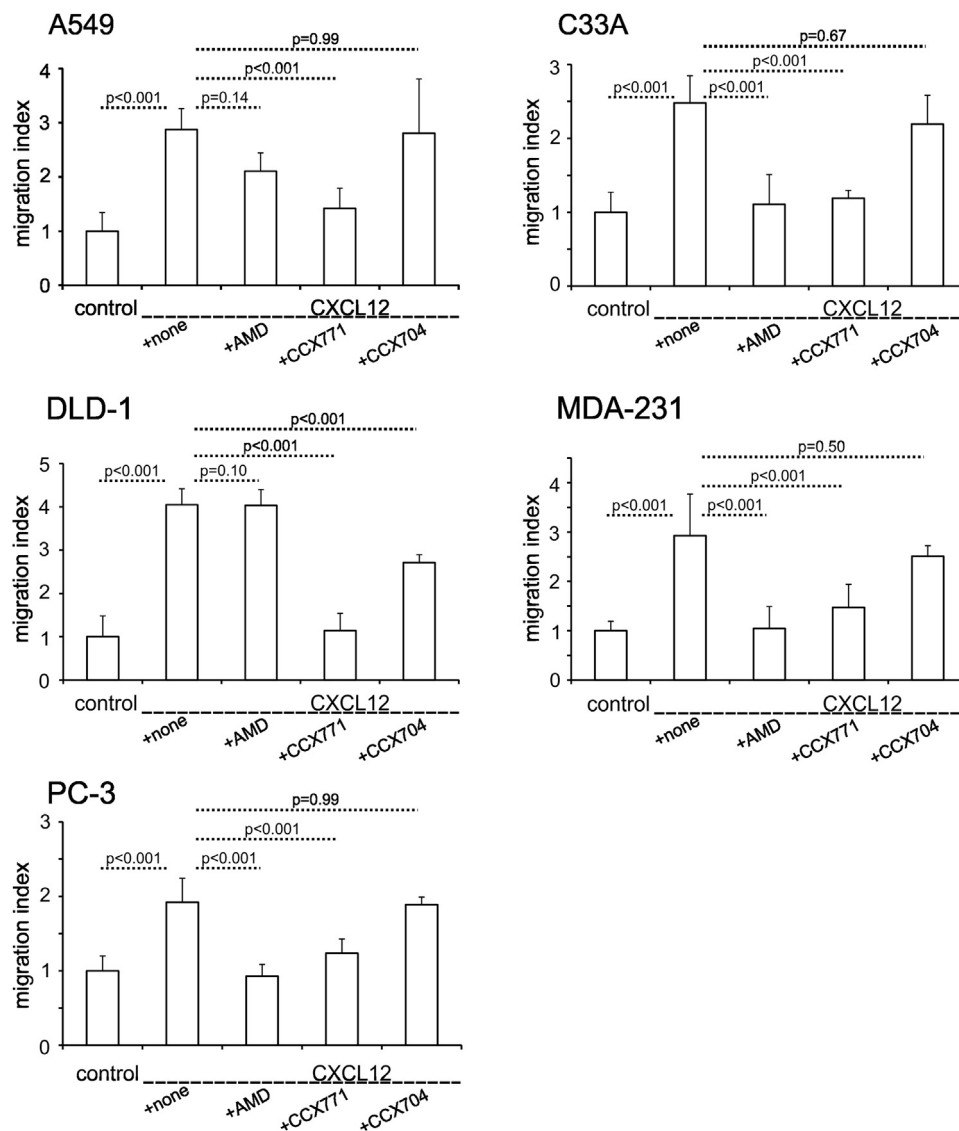


Fig. 2. Contribution of CXCR4 and CXCR7 to CXCL12-dependent chemotaxis of tumor cell lines. Cultured tumor cells were maintained for 1 h in the presence or absence of either AMD3100 (10 μ M), CCX771 (100 nM) or CCX704 (100 nM) and CXCL12-dependent chemotaxis was assayed in a modified Boyden chamber. The number of cells migrating in the absence of the chemokine was set to 1. Bars show the average migration index (\pm SD) as determined in 3–12 experiments. CXCL12 induced migration of all tumor cell lines. In C33A, MDA-231, and PC-3 cells, both AMD3100 and CCX771 attenuated CXCL12-dependent migratory responses, whereas migratory responses of A549 and DLD-1 cells were only sensitive to CCX771.

increases in C33A cell numbers were sensitive to both AMD3100 and CXCR771 (Fig. 4). However, discrepant from chemotaxis, only AMD3100, but not CCX771, attenuated CXCL12-induced increases in MDA-231 and PC-3 cell numbers (Fig. 4). Collectively, these findings establish that the organization of the CXCL12 system differs within the tumor cell lines examined, and further reveal that within distinct tumor cell lines, different CXCL12 receptors control different cell functions.

3.3. Subcellular localization of CXCL12 receptors in tumor cell lines

The observed differential use of CXCR4 and CXCR7 by the different tumor cell lines prompted us to more closely define the subcellular localization of CXCL12 receptors in these cells (Fig. 5). For this analysis more than 100 cells of each tumor line were examined. Double-labeling of cells transfected with control siRNA with selective CXCR4 and CXCR7 antibodies demonstrated the predominant association of CXCR7 with the outer plasma membrane of C33A, DLD-1, MDA-231, and PC-3 cells and the partial association of CXCR7 within intracellular structures in DLD-1 and MDA-231 cells. In all these cells, CXCR4 was associated with both intracellular structures and to varying degrees with the outer

cell membrane (Fig. 5A). Moreover, CXCR7 and CXCR4 labelling widely overlapped in the plasma membrane of DLD-1 cells, but was predominantly restricted to different parts of the plasma membrane of MDA-231 cells (Fig. 5A). In MDA-231 cells, CXCR4 staining was further associated with the nucleus as previously shown for other cancer cells [12]. A549 cells were unique since both CXCR7 and CXCR4 labelling was predominantly present within intracellular structures with an especially high co-localization of both receptors around the nucleus (Fig. 5A). In case of MDA-231 cells, differences in the subcellular localization of CXCR4 and CXCR7 were confirmed by flow cytometry (Suppl. Fig. 2). This approach likewise demonstrated the predominant location of CXCR4 within intracellular structures and the association of CXCR7 with both the outer cell membrane and intracellular structures. Together, these findings unravel that the subcellular localization of CXCR4 and CXCR7 differs across different tumor cell lines.

3.4. Effects of cellular depletion of 5T4 on the use of CXCL12 receptors and their subcellular distribution

To assess putative influences of 5T4 on the use of CXCL12 receptors

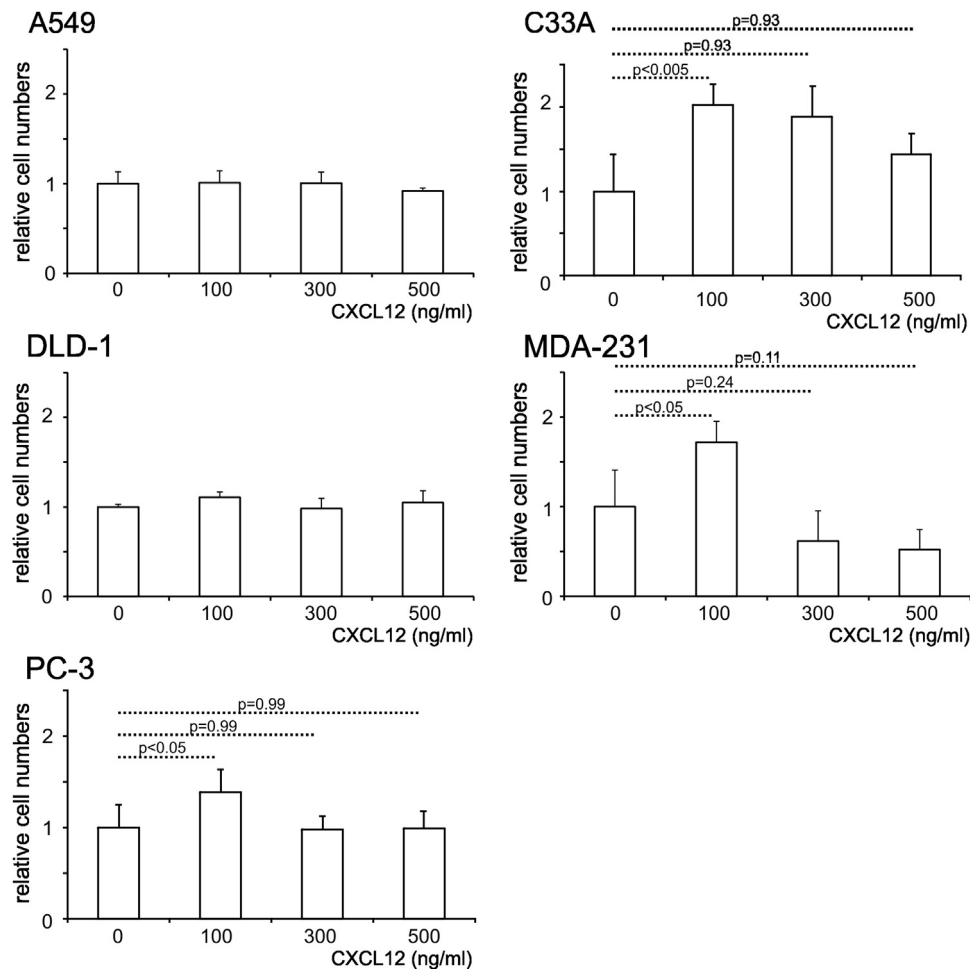


Fig. 3. Effects of CXCL12 on tumor cell numbers. Tumor cell cultures were maintained for 48 h with varying concentrations of CXCL12 and subsequently analyzed for cell numbers by MTT assay. Cell numbers present in untreated controls were set to 1. Bars show relative cell numbers (mean \pm SD) as determined in 3–7 experiments. CXCL12 at 100 ng/ml increased numbers of C33A, MDA-231, and PC-3 cells, but not those of A549 and DLD-1 cells. Stimulatory effects of CXCL12 on cell numbers either declined or became undetectable with increasing concentrations of CXCL12.

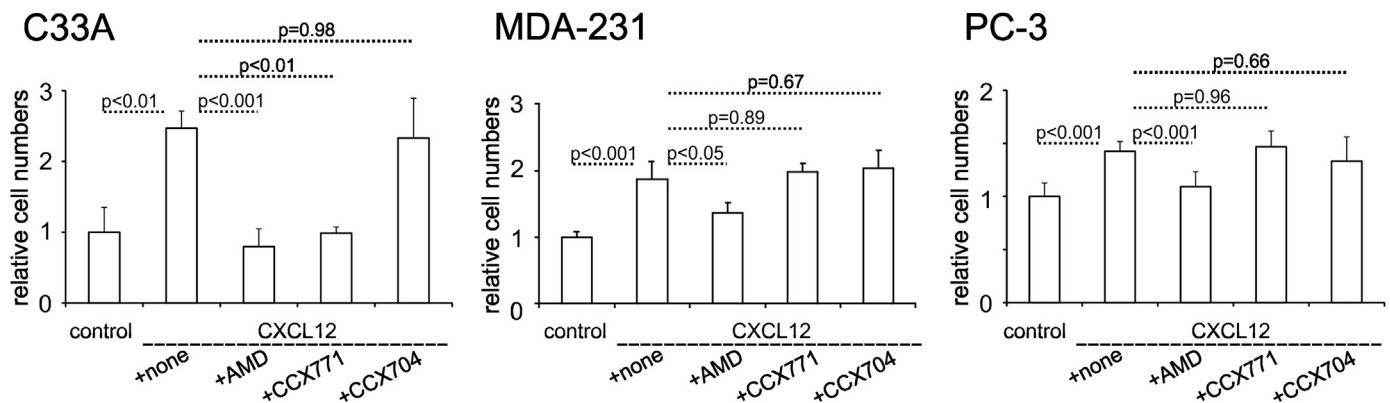


Fig. 4. Contribution of CXCR4 and CXCR7 to CXCL12-induced increases in tumor cell numbers. Cultured tumor cells were treated for 48 h with CXCL12 (100 ng/ml) in combination with AMD3100 (10 μ M), CXCR771 (100 nM) or CXCR704 (100 nM) as indicated and subsequently analyzed for cell numbers by MTT assay. Cell numbers present in untreated controls were set to 1. Bars represent relative cell numbers (mean \pm SD) as determined in 3–11 experiments. CXCL12-induced increases in C33A cell numbers were sensitive to both AMD3100 and CXCR771 whereas the effects of CXCL12 on numbers of MDA-231 and PC-3 cells were only attenuated by AMD3100.

in the various cancer cell lines, we inhibited cellular 5T4 expression by RNA interference. Transfection with different pre-designed 5T4-siRNAs resulted in a 60–90% drop of 5T4 expression when compared to cells transfected with scrambled control siRNA (Fig. 6; Suppl. Fig. 1, Table 1). In most cell lines, the decline in 5T4 expression was not associated with obvious changes in CXCR4 and CXCR7 expression levels

(Fig. 6; Suppl. Fig. 1, Table 1). Only in DLD-1 cells, siRNA-dependent inhibition of 5T4 expression resulted in a pronounced, approximately 60% decline in CXCR7, but not in CXCR4 levels, as evidenced by both Western blotting and immunocytochemistry (Fig. 6; 5B; Table 1). Transfection of C33A, DLD-1, MDA-231, and PC-3 cells with 5T4 siRNAs further remained without obvious effects on the subcellular

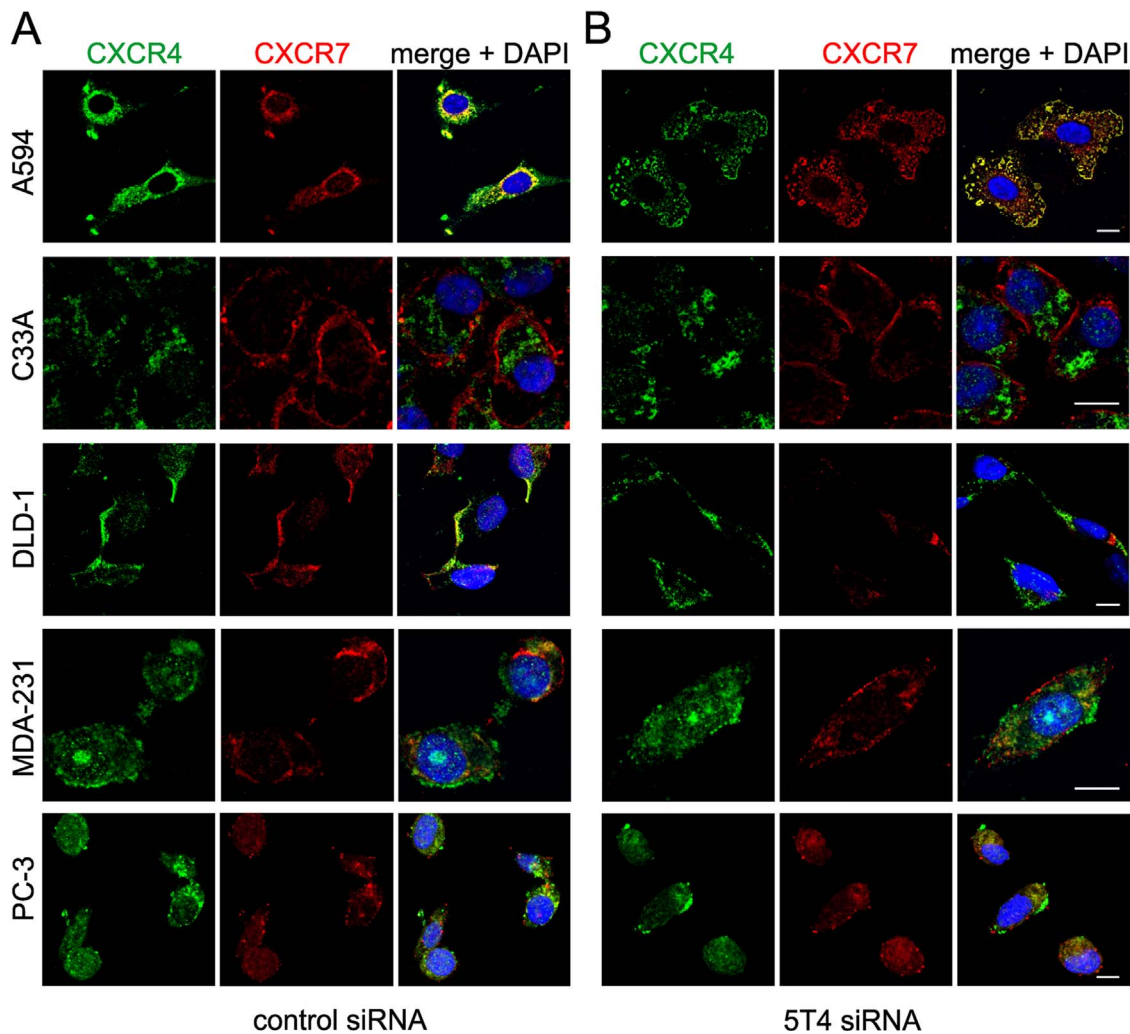


Fig. 5. Subcellular localization of CXCR4 and CXCR7 in tumor cell lines with normal and depleted 5T4 expression. Tumor cells transfected with either control siRNA (A) or 5T4 siRNA (B) were double labeled with antibodies against CXCR4 (green) and CXCR7 (red). Cell nuclei were visualized by DAPI (blue). With exception of A594 cells, the subcellular distribution of both CXCL12 receptors is not affected by depletion of 5T4 in the various cell lines. In DLD-1 cells, depletion of 5T4 further resulted in decreased CXCR7 protein. Scale bars, 10 μ m.

distribution of CXCR4 and CXCR7 as observed in > 100 cells of each cell line (Fig. 5B, Suppl. Fig. 1, Table 2). By contrast, following transfection with 5T4 siRNA, A549 cells attained a flat morphology and additionally exhibited a relocation of CXCR4 and CXCR7 from perinuclear sites to the plasma membrane and cytoplasmic structures (Fig. 5B). Despite receptor re-localization, CXCR4 and CXCR7 staining still largely overlapped in 5T4-depleted A549 cells (Fig. 5B).

To assess whether depletion of 5T4 would alter the use of CXCL12 receptors, we reanalyzed the effects of AMD3100 and CX771 on CXCL12-induced chemotaxis in tumor cell lines previously transfected with 5T4 siRNA. We refrained from performing this analysis for CXCL12-induced cell proliferation since only a selection of the cell lines responded to the chemokine with increases in cell numbers (see Fig. 3). We found unchanged sensitivity of CXCL12-induced cell migration towards AMD3100 and/or CX771 in A549, C33A, and MDA-231 cells with reduced 5T4 levels when compared to their wild-types (Figs. 2 and 7, Table 2). The slight decline of the migration index of C33A cells apparent in the presence of CX704 was again likewise detectable in C33A cells treated with DMSO alone. Contrasting the findings with A549, C33A, and MDA-231 cells, 5T4-depleted PC-3 cells only showed sensitivity to AMD3100, but no longer to CX771 (Figs. 2 and 7). Finally, it is noteworthy that in A549, C33A, DLD-1, but not in MDA-231 and PC-3 cells, RNAi-mediated depletion of 5T4 *per se* attenuated the chemotactic response of the cells towards CXCL12 (Figs. 2 and 7), an

effect not detectable in cells transfected with control siRNA (Suppl. Fig. 3). This decline was most prominent in 5T4 siRNA-transfected DLD-1 cells and amounted to 70% ($p < 0.001$) when compared to cells transfected with control siRNA. It is of note that this decline related to a pronounced loss of CXCR7 in 5T4-depleted DLD-1 cells (Fig. 6), the CXCL12 receptor subtype mediating chemotaxis in these cells (see Fig. 2). Depletion of 5T4 in A549 and C33A cells reduced chemotactic responses by 45% ($p < 0.001$) and 31% ($p < 0.001$), respectively. Collectively, these findings unravel that 5T4 is essential for the function of the CXCL12 system in some, but not in the majority of cancer cell lines. In addition, these observations unravel that 5T4 *per se* controls migration of selected tumor cells.

Since 5T4 was shown to attenuate CXCL12-dependent cell proliferation [5], we further asked how RNAi-mediated depletion of 5T4 in tumor cells would interfere with their mitogenic responses to CXCL12. Cellular depletion of 5T4 *per se* resulted in a 160–200% increase in numbers of C33A and MDA-231, but not of PC-3 cells when compared to cultures transfected with control siRNA (Fig. 8). Treatment of 5T4 siRNA-transfected C33A, MDA-231, and PC-3 cells with CXCL12 further increased cell numbers by roughly 150% (Fig. 8). Together, these findings establish that 5T4 *per se* affects proliferation of distinct tumor cells. In addition, the findings provide evidence that 5T4 does not modulate mitogenic function of CXCL12 in all type of cells.

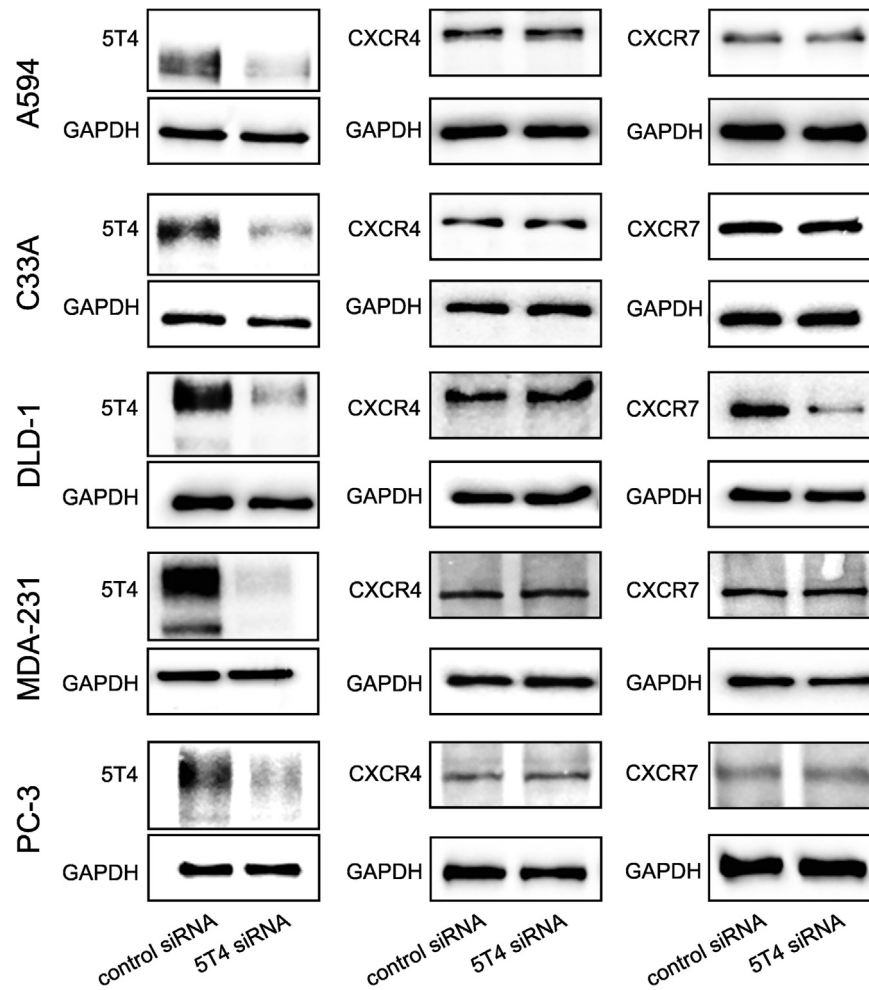


Fig. 6. Inhibition of cellular 5T4 expression by RNA interference. Cultured tumor cells were maintained for 1 h with serum-free medium and transfected with predesigned 5T4 siRNA or scrambled control siRNA. Twenty four hours following transfection, cells were lysed and subjected to Western blot analysis for 5T4, CXCR4 and CXCR7. GAPDH served as loading control. In all tumor cell lines, RNAi allowed for a pronounced inhibition of 5T4 expression. In DLD-1 cells, depletion of 5T4 was associated with a decline in CXCR7, but not CXCR4 expression, whereas in all other tumor cells reduced 5T4 levels had no effect on CXCR4 and CXCR7 expression.

Table 1
Effects of 5T4 depletion on cellular protein levels.

Cell line	Protein	Protein level (fold change \pm SD) following 5T4 depletion	N	p-value (t-test)
A549	5T4	0.18 \pm 0.11	3	< 0.001
	CXCR4	0.94 \pm 0.24	3	ns
	CXCR7	0.95 \pm 0.15	3	ns
C33A	5T4	0.40 \pm 0.06	3	< 0.001
	CXCR4	0.97 \pm 0.09	3	ns
	CXCR7	0.96 \pm 0.03	3	ns
DLD-1	5T4	0.24 \pm 0.07	3	< 0.01
	CXCR4	1.16 \pm 0.22	3	ns
	CXCR7	0.40 \pm 0.08	3	< 0.05
MDA-231	5T4	0.09 \pm 0.08	3	< 0.01
	CXCR4	1.02 \pm 0.13	3	ns
	CXCR7	1.08 \pm 0.20	3	ns
PC-3	5T4	0.33 \pm 0.16	4	< 0.01
	CXCR4	0.96 \pm 0.24	3	ns
	CXCR7	1.06 \pm 0.13	3	ns

Tumor cells with depleted 5T4 levels were analyzed for expression of the indicated proteins by Western blotting. Labeled protein bands were quantified by densitometry and corrected for protein loading (GAPDH). Levels of respective proteins in non-transfected controls were set to 1. ns, not significant.

4. Discussion

Our present analysis was spurred by previous findings in murine embryonic fibroblasts and small cell lung carcinomas showing that 5T4 not only controls CXCR7 expression, but also dictates the preference of CXCL12 to either CXCR4 or CXCR7, in terms that CXCL12 binds to CXCR4 in the presence of 5T4 and to CXCR7 in its absence [24]. We could not confirm a general correlation between 5T4 expression and CXCL12 receptor preference in our present analysis of five different human tumor cell lines, namely cervical, colorectal, breast, prostate, and non-small cell lung cancer cells. Although the tumor cell lines expressed 5T4 to detectable levels, CXCL12 promoted chemotactic cell responses either through CXCR7 (A549, DLD-1) or both CXCL12 receptors (C33A, MDA-231, PC-3) (see Table 2). Moreover, MDA-231 and PC-3 cells only required CXCR4 whereas C33A cells required both CXCR4 and CXCR7 to respond to CXCL12 with increases in cell numbers. The other tumor cell lines failed to respond to CXCL12 with increased cell proliferation. Importantly, in most tumor cell lines (A594, C33A, MDA-231) this individual receptor dependency remained unchanged following RNAi-mediated inhibition of 5T4 expression (see Table 2). In DLD-1 cells, depletion of 5T4 resulted in a selective loss of CXCR7 expression and the subsequent impairment of CXCL12-dependent chemotaxis. Finally, 5T4-depleted PC-3 cells only used CXCR4 for CXCL12-dependent chemotaxis.

The finding that depending on the tumor cell line, cellular responses

Table 2
Summary of results obtained.

Control	Tumor cell line				
	A549	C33A	DLD-1	MDA-231	PC-3
Predominant location - CXCR7	intracellular	cell margin	intracellular/cell margin	intracellular/cell margin	cell margin
Predominant location - CXCR4	intracellular	intracellular	Intracellular/cell margin	Intracellular/cell margin	intracellular
Migratory response to CXCL12 - receptor involved	+	+	+	+	+
Proliferative response to CXCL12 - receptor involved	CXCR7	CXCR4/CXCR7	CXCR7	CXCR4/CXCR7	CXCR4/CXCR7
	+/-	+	+/-	+	+
		CXCR4/CXCR7		CXCR4	CXCR4
Inhibited 5T4 expression					
Predominant location - CXCR7	intracellular/cell margin	cell margin	(reduced expression)	intracellular/cell margin	cell margin
Predominant location - CXCR4	intracellular/cell margin	intracellular	Intracellular/cell margin	intracellular/cell margin	intracellular
Migratory response to CXCL12 - receptor involved	+	+	+/-	+	+
Proliferative response to CXCL12	CXCR7	CXCR4/CXCR7		CXCR4/CXCR7	CXCR4
	n.d.	+	n.d.	+	+

+, detectable response; +/- no response; n.d., not determined.

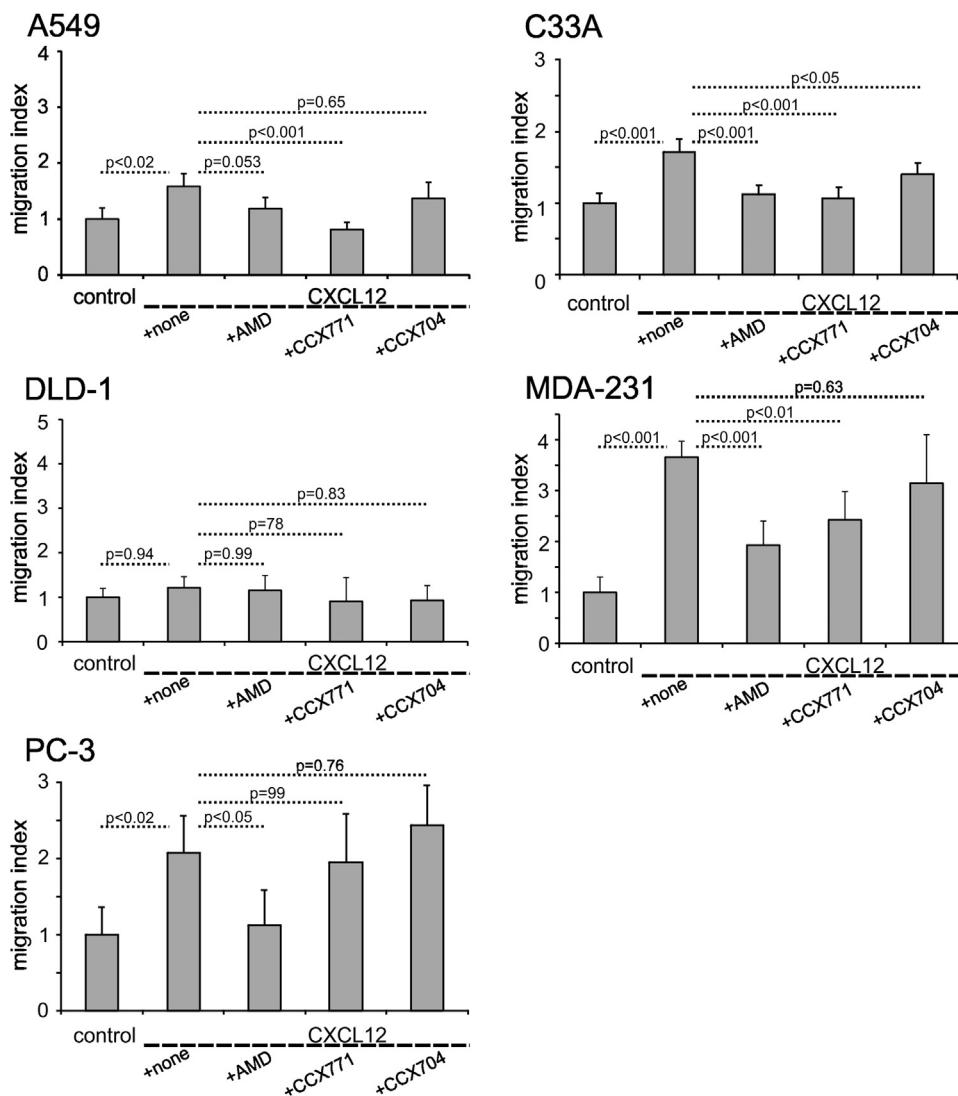


Fig. 7. Contribution of CXCR4 and CXCR7 to CXCL12-dependent chemotaxis of tumor cells with inhibited 5T4 expression. Tumor cell lines were transfected with 5T4 siRNA and assayed for effects of AMD3100, CCX771, and CCX704 on CXCL12-dependent chemotaxis as described in Fig. 2. The number of cells migrating in the absence of the chemokine was set to 1. Bars show the average migration index (\pm SD) as determined in 3–7 experiments. Depletion of 5T4 did not affect the sensitivity of CXCL12-dependent chemotaxis of A549, C33A, and MDA-231 cells towards AMD3100 and CCX771. However, depletion of 5T4 prevented CXCL12-dependent chemotaxis of DLD-1 cells, and resulted in a loss of sensitivity of CXCL12-induced chemotaxis of PC-3 cells to CCX771.

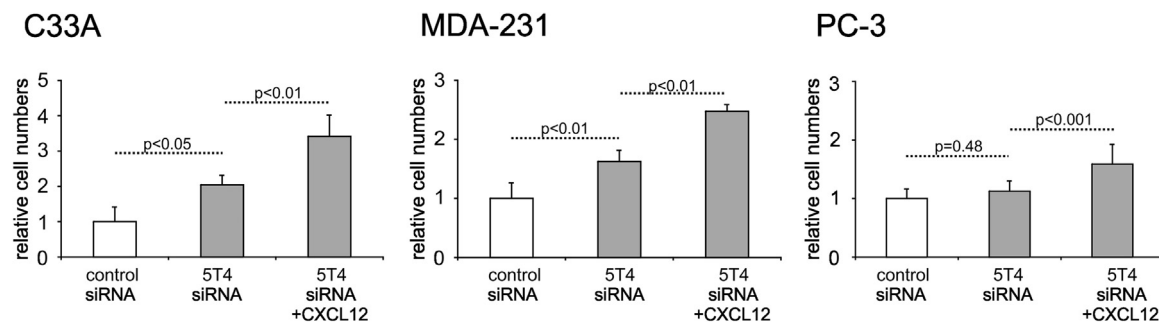


Fig. 8. Effects of 5T4 on the mitogenic potential of CXCL12. Tumor cell lines were transfected with 5T4 siRNA and maintained in the presence or absence of CXCL12 (100 ng/ml). Cells transfected with scrambled siRNA served as control. Cell numbers were subsequently determined by MTT assay. Cell numbers present in control siRNA-transfected tumor cells were set to 1. Bars show relative cell numbers (mean \pm SD) as determined in 3–12 experiments. Depletion of 5T4 *per se* increased numbers of C33A and MDA-231, but not of PC-3 cells. Following RNAi-mediated depletion of 5T4 all cell lines still responded to CXCL12 with increases in cell numbers.

of CXCL12 either involve CXCR7 and/or CXCR4 fits well with the emerging concept of the differential use of CXCL12 receptors by tumor cells [2]. This fact not only applies to different types of tumors, as evidenced by our present studies, but also to the same type of tumor from different patients or even to different cells within a given tumor. Inter-individual differences in the organization of the CXCL12 system are currently best documented for glioma. Depending on the patient, CXCL12-dependent glioma growth and mobility either occurs through CXCR4 or CXCR7 [13–16]. Another aspect of this heterogeneous organization is the control of different cell functions by different CXCL12 receptors [1,8–10]. Notably, this level of heterogeneity was absent in most of cancer cell lines examined, but present in MDA-231 and PC-3 cells, as judged from the demonstration that antagonizing either CXCR4 or CXCR7 attenuated CXCL12-induced migration of these cells, whereas antagonizing CXCR4, but not CXCR7, prevented CXCL12-dependent proliferation of both cell lines. Previously, other groups reported that CXCL12 controls migration of A549 cells through CXCR4 and proliferation of PC-3 cells through CXCR7 [17,18]. These discrepant findings could well reflect the fact that even the use of different culture conditions might influence the organization of the CXCL12 system in these cells.

Interestingly, C33A, MDA-231, and PC-3 cells failed to respond to CXCL12 with cell migration and/or proliferation following inactivation of either CXCR4 or CXCR7. This is reminiscent of our previous findings with primary Schwann cells and microglia which likewise required both CXCL12 receptors for CXCL12-dependent cell responses [6,7]. We currently consider these observations as an indication that in various cells, CXCR7 not simply modulates activity of CXCR4 as originally suggested [19], but together with CXCR4 forms an active signaling unit. Whether this signaling unit depends on the formation of CXCR7/CXCR4 heterodimers or the cross talk of down-stream signaling pathways still awaits clarification.

It is well established that the subcellular localization of CXCL12 receptors differs between cells and is either associated with the plasma membrane, intracellular structures, or both [7,13,20–23]. In all cancer cell lines except A549 cells, CXCR7 was preferentially associated with the outer cell membrane. Moreover, in all tumor lines CXCR4 localized to a varying degree to intracellular structures and the outer cell membrane. Again with exception of A549 cells, depletion of 5T4 did not result in an obvious re-localization of CXCL12 receptors in the tumor cell lines examined. Depletion of 5T4 in A549 cells induced a re-localization of CXCR7 and CXCR4 from perinuclear sites to intracellular structures and the outer cell membrane. These findings clearly contrast the previous observation made in other cell types that CXCR7 only localizes to the surface of cells lacking 5T4 [5]. Even more importantly, the subcellular distribution of CXCL12 receptors in a given tumor cell line did not allow any conclusion to the specific use of CXCR7 and/or CXCR4 in the respective cells. The absence of such a correlation could well reside within the fact that differences in the subcellular

localization of CXCL12 receptors do *per se* not reflect trafficking of CXCR4 and/or CXCR7 between the outer cell membrane and intracellular compartments and, hence, their involvement in CXCL12 signaling of a given cell [24–26].

We further failed to detect general modulatory influences of 5T4 on CXCL12-induced proliferation of the various tumor cell lines as previously reported for other types of cells [5]. However, in line with previous work [27–30], we found that in distinct tumor cell lines, 5T4 modulates CXCL12-induced chemotaxis as well as basal cell proliferation *per se*. Indeed, siRNA-mediated depletion of 5T4 attenuated CXCL12-dependent migration of C33A cells without affecting expression or subcellular localization of CXCL12 receptors. A different situation applied for DLD-1 and A549 cells. In DLD-1, depletion of 5T4 inhibited CXCR7 expression and, hence, CXCL12-dependent chemotaxis, whereas in A549 cells, reduced cell migration was accompanied by altered cell shape and re-distribution of CXCL12 receptors. Modulatory influences of 5T4 on basal cell proliferation became evident with C33A and MDA-231 cells, which increased in numbers following depletion of 5T4. Except for DLD-1 cells, the mechanisms by which 5T4 controls cell proliferation and/or migration are still unknown.

5. Conclusions

Based on the potent effects of CXCL12 on proliferation, survival, and migration of a large variety of tumor cells, the CXCL12 system is currently regarded as a prime target for therapeutic intervention in many types of tumors [1,31–33]. This view spurred considerable interest over recent years to target CXCR4 and CXCR7 by selective peptides, small molecule inhibitors or single domain antibodies [32,34–36]. Our work now emphasizes the fact that with this therapeutic approach, optimal benefits can only be achieved when the exact organization of the CXCL12 system in the respective patient/tumor is known. Unfortunately, our present work does not support a correlation between 5T4 expression and organization of the CXCL12 system in tumor cells, and, hence, dismisses 5T4 as a potential marker for the cellular organization of the CXCL12 system.

Acknowledgements

We thank Dr. James Campbell, ChemoCentryx, for providing us with CCX771 and CCX704. The skillful technical assistance of Florian Kirmse is gratefully acknowledged.

Funding

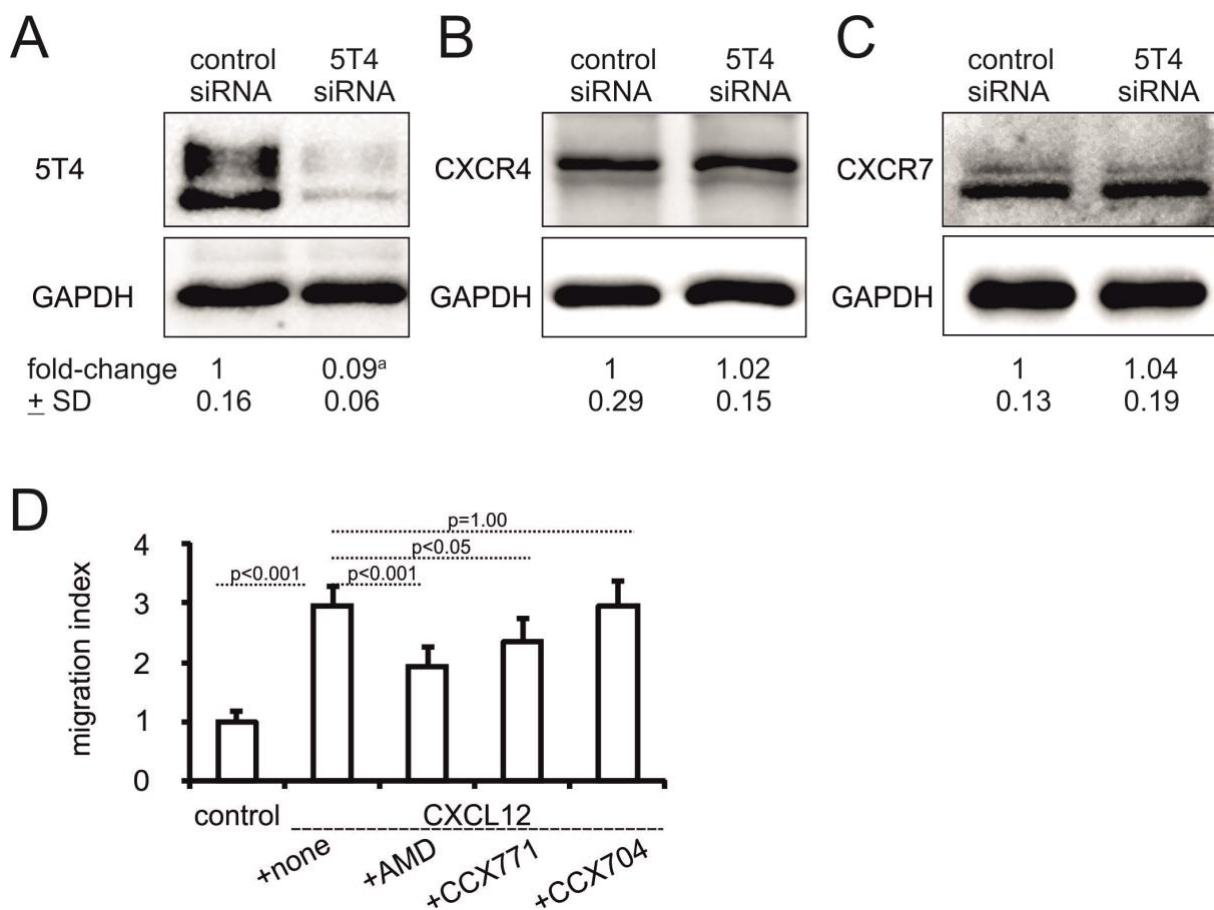
This work was supported by a stipend from the Medical Faculty of the University of Leipzig to CK.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.02.001>.

References

- [1] S. Chatterjee, B. Behnam Azad, S. Nimmagadda, The intricate role of CXCR4 in cancer, *Adv. Cancer Res.* 124 (2014) 31–82.
- [2] M. Puchert, J. Engele, The peculiarities of the SDF-1/CXCL12 system: in some cells, CXCR4 and CXCR7 sing solos, in others, they sing duets, *Cell Tissue Res.* 355 (2) (2014) 239–253.
- [3] P.L. Stern, J. Brazzatti, S. Sawan, O.J. McGinn, Understanding and exploiting 5T4 oncofoetal glycoprotein expression, *Semin. Cancer Biol.* 29 (2014) 13–20.
- [4] P.J. Southall, G.M. Boxer, K.D. Bagshawe, N. Hole, M. Bromley, P.L. Stern, Immunohistological distribution of 5T4 antigen in normal and malignant tissues, *Br. J. Cancer* 61 (1) (1990) 89–95.
- [5] O.J. McGinn, G. Marinov, S. Sawan, P.L. Stern, CXCL12 receptor preference, signal transduction, biological response and the expression of 5T4 oncofoetal glycoprotein, *J. Cell Sci.* 125 (Pt 22) (2012) 5467–5478.
- [6] V. Ödemis, K. Boosmann, A. Heinen, P. Kürty, J. Engele, CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells, *J. Cell Sci.* 123 (Pt 7) (2010) 1081–1088.
- [7] J. Lipfert, V. Ödemis, D.C. Wagner, J. Boltze, J. Engele, CXCR4 and CXCR7 for a functional receptor unit for SDF-1/CXCL12 in primary rodent microglia, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 39 (6) (2013) 667–680.
- [8] J. Jin, W.C. Zhao, F. Yuan, CXCR7/CXCR4/CXCL12 axis regulates the proliferation, migration, survival and tube formation of choroid-retinal endothelial cells, *Ophthalmic Res.* 50 (1) (2013) 6–12.
- [9] L. Hernandez, M.A. Magalhaes, S.J. Coniglio, J.S. Condeelis, J.E. Segall, Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis, *Breast Cancer Res.* 13 (6) (2011) R128.
- [10] X. Dai, Y. Tan, S. Cai, X. Xiong, L. Wang, Q. Ye, X. Yan, K. Ma, L. Cai, The role of CXCR7 on the adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells, *J. Cell Mol. Med.* 15 (6) (2011) 1299–1309.
- [11] V. Ödemis, J. Lipfert, R. Kraft, P. Hajek, G. Abraham, K. Hattermann, R. Mentlein, J. Engele, The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells, *Glia* 60 (2012) 372–381.
- [12] Z. Xu, P. Li, D. Wei, Z. Wang, Y. Bao, J. Sun, L. Qu, L. Wang, NMMHC-IIA-dependent nuclear location of CXCR4 promotes migration and invasion in renal cell carcinoma, *Oncol. Rep.* 36 (5) (2016) 2681–2688.
- [13] C. Calatozzolo, A. Canazza, B. Pollo, E. Di Pierro, E. Ciusani, E. Maderna, E. Salce, V. Sponza, S. Frigerio, F. Di Meco, S. Schinelli, A. Salmaggi, Expression of the new CXCL12 receptor, CXCR7, in gliomas, *Cancer Biol. Ther.* 11 (2) (2011) 242–253.
- [14] A. do Carmo, I. Patricio, M.T. Cruz, H. Carvalheiro, C.R. Oliveira, M.C. Lopes, CXCL12/CXCR4 promotes motility and proliferation of glioma cells, *Cancer Biol. Ther.* 9 (1) (2010) 56–65.
- [15] C. Liu, K. Pham, D. Luo, B.A. Reynolds, P. Hothi, G. Foltz, J.K. Harrison, Expression and functional heterogeneity of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 in primary patient-derived glioblastoma cells, *PLoS One* 8 (3) (2013) e59750.
- [16] Y. Liu, E. Carson-Walter, K.A. Walter, Targeting chemokine receptor CXCR7 inhibits glioma cell proliferation and mobility, *Anticancer Res.* 35 (1) (2015) 53–64.
- [17] Y.H. Choi, M.D. Burdick, B.A. Strieter, B. Mehrad, R.M. Strieter, CXCR4, but not CXCR7, discriminates metastatic behavior in non-small cell lung cancer cells, *Mol. Cancer Res.* 12 (1) (2014) 38–47.
- [18] R.K. Singh, B.L. Lokeshwar, The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth, *Cancer Res.* 71 (9) (2011) 3268–3277.
- [19] F. Sierro, C. Biben, L. Martínez-Muñoz, M. Mellado, R.M. Ransohoff, M. Li, B. Woehl, H. Leung, J. Groom, M. Batten, R.P. Harvey, C. Martínez-A, C.R. Mackay, F. Mackay, Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (37) (2007) 14759–14764.
- [20] E.B. Cepeda, T. Dedulua, J. Fernando, E. Bertran, G. Egea, E. Navarro, I. Fabregat, Mechanisms regulating cell membrane localization of the chemokine receptor CXCR4 in human hepatocarcinoma cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1853 (5) (2015) 1205–1218.
- [21] R.A. Pelekanos, M.J. Ting, V.S. Sardesai, J.M. Ryan, Y.C. Lim, J.K. Chan, N.M. Fisk, Intracellular trafficking and endocytosis of CXCR4 in fetal mesenchymal stem/stromal cells, *BMC Cell Biol.* 15 (2014) 15.
- [22] S. Pinto, A. Martínez-Romero, J.E. O'Connor, R. Gil-Benso, T. San-Miguel, L. Terrádez, C. Monteagudo, R.C. Callaghan, Intracellular coexpression of CXCR4 and CXCR7 receptors and their ligands in human melanoma cell lines and dynamic variations after xenotransplantation, *BMC Cancer* 14 (2014) 118.
- [23] H.Y. Kim, S.Y. Lee, D.Y. Kim, J.Y. Moon, Y.S. Choi, I.C. Song, H.J. Lee, H.J. Yun, S. Kim, D.Y. Jo, Expression and functional roles of the chemokine receptor CXCR7 in acute myeloid leukemia cells, *Blood Res.* 50 (4) (2015) 218–226.
- [24] B. Zhu, D. Xu, X. Deng, Q. Chen, Y. Huang, H. Peng, Y. Li, B. Jia, W.B. Thoreson, W. Ding, J. Ding, L. Zhao, Y. Wang, K.L. Wavrin, S. Duan, J. Zheng, CXCL12 enhances human neural progenitor cell survival through a CXCR7- and CXCR4-mediated endocytotic signaling pathway, *Stem Cells* 30 (11) (2012) 2571–2583.
- [25] K.E. Luker, J.M. Steele, L.A. Mihalko, P. Ray, G.D. Luker, Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands, *Oncogene* 29 (32) (2010) 4599–4610.
- [26] G. Brooke, H. Tong, J.P. Levesque, K. Atkinson, Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta, *Stem Cells Dev.* 17 (5) (2008) 929–940.
- [27] T.D. Southgate, O.J. McGinn, F.V. Castro, A.J. Rutkowski, M. Al-Muftah, G. Marinov, G.J. Smethurst, D. Shaw, C.M. Ward, C.J. Miller, P.L. Stern, CXCR4-mediated chemotaxis is regulated by 5T4 oncofoetal glycoprotein in mouse embryonic cells, *PLoS One* 5 (4) (2010) e9982.
- [28] F.V. Castro, O.J. McGinn, S. Krishnan, G. Marinov, J. Li, A.J. Rutkowski, E. Elkord, D.J. Burt, M. Holland, R. Vaghjiani, A. Gallego, V. Saha, P.L. Stern, 5T4 oncofoetal antigen is expressed in high risk of relapse childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia and is associated with a more invasive and chemotactic phenotype, *Leukemia* 26 (7) (2012) 1487–1498.
- [29] C.J. Carsberg, K.A. Myers, G.S. Evans, T.D. Allen, P.L. Stern, Metastasis-associated 5T4 oncofoetal antigen is concentrated at microvillus projections of the plasma membrane, *J. Cell Sci.* 108 (Pt 8) (1995) 2905–2916.
- [30] A.M. Woods, W.W. Wang, D.M. Shaw, C.M. Ward, M.W. Carroll, B.R. Rees, P.L. Stern, Characterization of the murine 5T4 oncofoetal antigen: a target for immunotherapy in cancer, *Biochem. J.* 366 (Pt 1) (2002) 353–365.
- [31] C. Freitas, A. Desnoyer, F. Meuris, F. Bachelier, K. Balabanian, V. Machelon, The relevance of the chemokine receptor CXCR3/CXCR7 on CXCL12-mediated effects in cancers with a focus on virus-related cancers, *Cytokine Growth Factor Rev.* 25 (3) (2014) 307–316.
- [32] C. Xu, H. Zhao, H. Chen, Q. Yao, CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting, *Drug Des. Devel. Ther.* 9 (2015) 4953–4964.
- [33] P. Weitzenfeld, A. Ben-Baruch, The chemokine system, and its CCR5 and CXCR4 receptors, as potential targets for personalized therapy in cancer, *Cancer Lett.* 352 (1) (2014) 36–53.
- [34] R. Würth, A. Bajetto, J.K. Harrison, F. Barbieri, T. Florio, CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment, *Front. Cell Neurosci.* 8 (2014) 144.
- [35] D. Maussang, A. Mujić-Delić, F.J. Descamps, C. Stortelers, P. Vanlandschoot, M. Stigter-van Walsum, H.F. Vischer, M. van Roy, M. Vosjan, M. Gonzalez-Pajuelo, G.A. van Dongen, P. Merchiers, P. van Rompaey, M.J. Smit, Llama-derived single variable domains (nanobodies) directed against chemokine receptor CXCR7 reduce head and neck cancer cell growth in vivo, *J. Biol. Chem.* 288 (41) (2013) 29562–29572.
- [36] K. Griffiths, O. Dolezal, B. Cao, S.K. Nilsson, H.B. See, K.D. Pfleger, M. Roche, P.R. Gorry, A. Pow, K. Viduka, K. Lim, B.G. Lu, D.H. Chang, T. Murray-Rust, M. Kvasnakul, M.A. Perugini, C. Dogovski, M. Doerflinger, Y. Zhang, K. Parisi, J.L. Casey, S.D. Nuttall, M. Foley, i-bodies, human single domain antibodies that antagonize chemokine receptor CXCR4, *J. Biol. Chem.* 291 (24) (2016) 12641–12657.



Supplementary Fig. 1

Verification of findings from RNA interference.

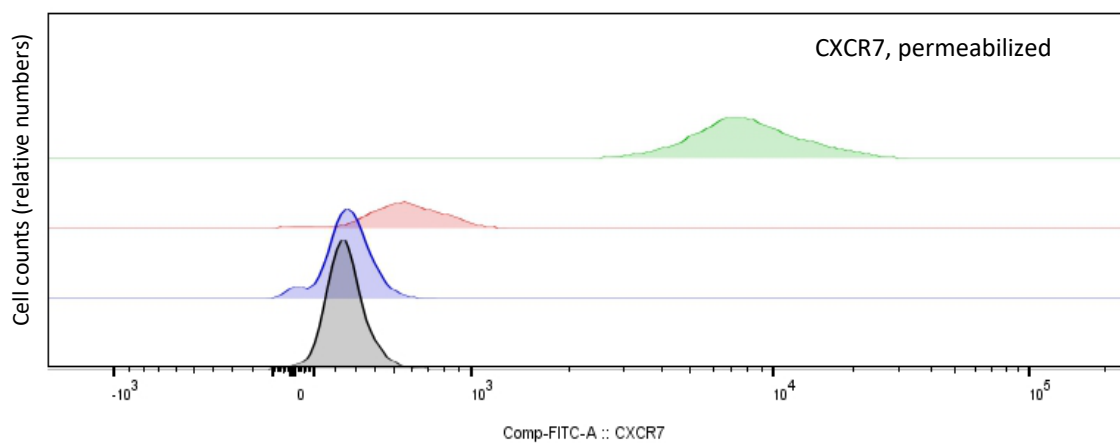
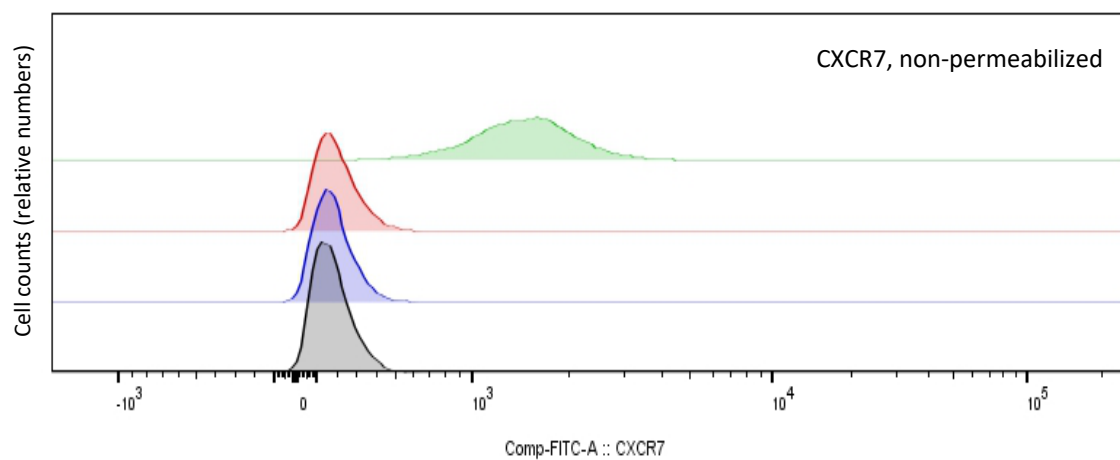
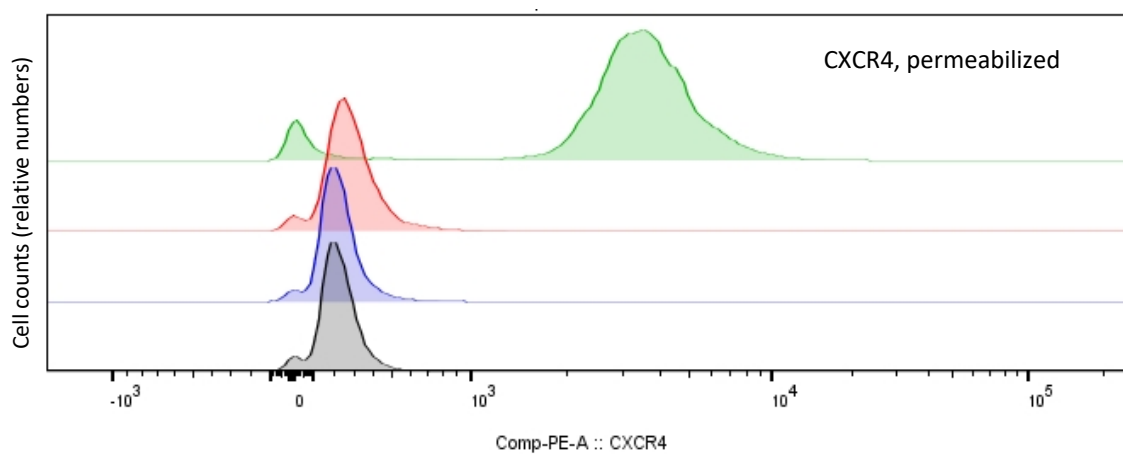
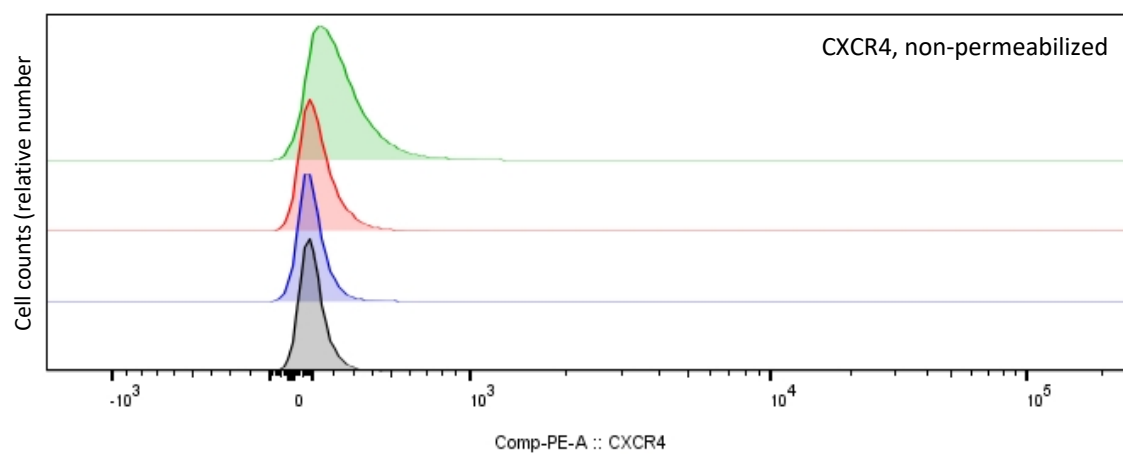
(A) Transfection of MDA-231 cells with an alternative 5T4 siRNA (SI104192811) resulted in a decline in 5T4 protein levels which was indistinguishable from that seen with the original 5T4 siRNA (SI03194478; see also Fig. 6).

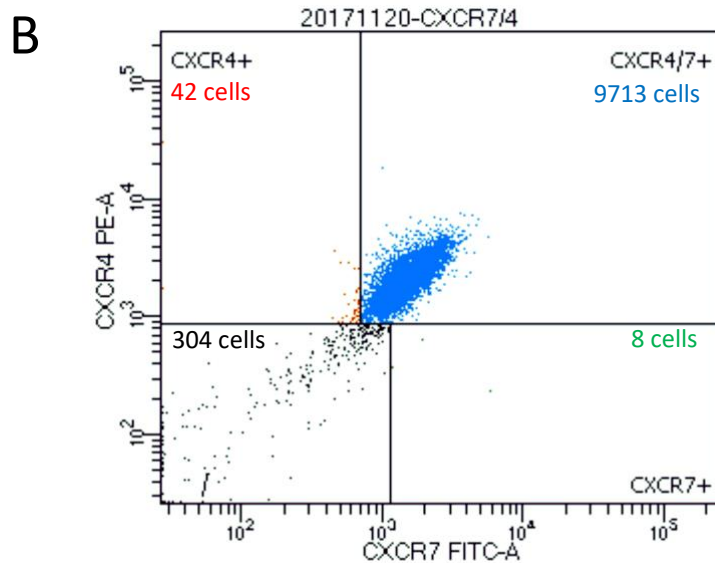
(B, C) Western blot analysis demonstrating that inhibition of 5T4 expression by alternative 5T4 siRNA does again not affect expression levels of (B) CXCR4 and (C) CXCR7.

Numbers in A-C indicate average changes (\pm SD, $n = 3$) in protein levels as determined by densitometric analysis of immunoreactive protein bands, corrected for protein loading (GAPDH). Respective protein levels present in cells transfected with control siRNA were set to 1. ^a $p < 0.001$, 5T4 siRNA vs. control siRNA.

(D) Chemotactic analysis of MDA-231 cells transfected with alternative 5T4 siRNA confirmed that CXCL12-induced cell migration is sensitive to both AMD3100 and CCX771, but not affected by the control peptide, CCX704.

A





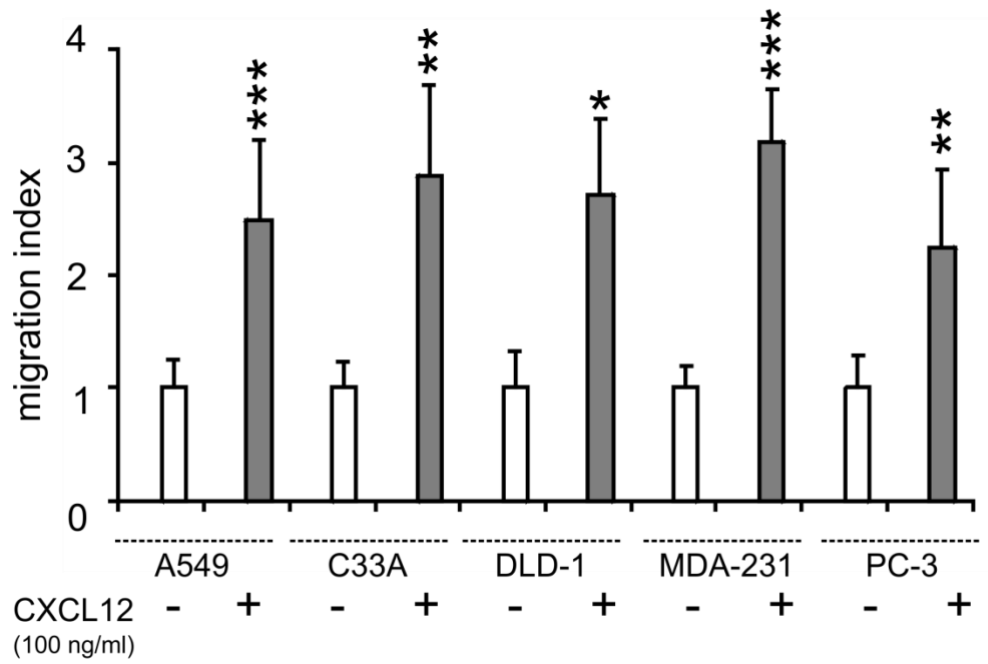
Supplementary Fig. 2

(A) Flow cytometric analysis of the subcellular location of CXCR4 and CXCR7 in MDA-231 cells.

Flow cytometry was performed on non-permeabilized and permeabilized (fixed with BD Cytofix/Cytoperm) MDA-231 cells, stained with monoclonal mouse anti CXCR7 antibodies (clone 11G8, MAB42273, R&D Systems) or goat anti CXCR4 antibodies (ab1670, Abcam) in combination with appropriate secondary FITC- or PE-labelled antibodies (green). Cells either stained with the secondary (red) and primary (blue) antibodies alone or with no antibodies (black) served as controls. The forward narrow-angle light scatter was used to exclude dead and aggregated cells. Both CXCR4 and CXCR7 are primarily localized within intracellular structures and to a lesser extent at the outer cell membrane.

(B) Population of CXCR4 / CXCR7 double-expressing MDA-231 cells.

Flow cytometry was performed with permeabilized MDA-231 cells, double-labelled with CXCR4 (ab1670, Abcam) and CXCR7 (AP17961PU-N, Acris) antibodies. The vast majority of cells (97%) showed co-expression of both CXCL12 receptors.



Supplementary Fig. 3

Analysis of the CXCL12-dependent chemotactic response of tumor cell lines following transfection with control siRNA.

Tumor cells were transfected with control siRNA and submitted after 24h to chemotactic analysis for CXCL12 (100 ng/ml) using a modified Boyden chamber. The number of cells migrating in the absence of the chemokine was set to 1. Bars represent the migration index (mean \pm SD) as determined in 3-9 independent experiments. ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05.

6 Zusammenfassung

Publikationspromotion zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med. an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Titel: **Der Einfluss des onkofetalen Glykoproteins 5T4 auf das CXCL12-System in humanen Tumorzelllinien**

eingereicht von: Christian Koch

angefertigt am: Institut für Anatomie
Medizinische Fakultät
Universität Leipzig

betreut von: Prof. Dr. rer. biol. hum. Jürgen Engele

Dr. rer. nat. Malte Puchert

eingereicht im: Januar 2019

Das Chemokin CXCL12/SDF-1 und seine beiden Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 spielen eine zentrale Rolle in der Tumorgenese und tragen über die Initiierung von Migration, Invasion, Proliferation und Angiogenese maßgeblich zur Mortalität durch Krebserkrankungen bei. Lange Zeit galt das Paradigma, dass diese aktiven CXCL12-Funktionen ausschließlich über den klassischen GPCR CXCR4 vermittelt werden, wohingegen der atypische Chemokinrezeptor CXCR7 als Scavengerrezeptor angesehen wurde. Insbesondere im Laufe der letzten zehn Jahre wurde immer klarer, dass die CXCL12-CXCR4-CXCR7-Signaltransduktion sehr viel komplexer organisiert ist. So kann CXCR7 sowohl aktive Signaltransduktion vermitteln als auch durch Heterodimerisierungsprozesse das Signalverhalten von CXCR4 modulieren oder in bestimmten Fällen zusammen mit CXCR4 die eigentlich aktive Signaleinheit bilden.

Das onkofetale Glykoprotein 5T4 wird auf vielen Tumorzellen u.a. im Laufe der epithelial-mesenchymalen-Transformation exprimiert und gilt als unabhängiger

negativer prognostischer Marker. Stern et al. (2012) stellten anhand Ihrer Befunde mit embryonalen Mäusefibroblasten und Tumorzelllinien die These auf, dass die Expression von 5T4 die Organisation des CXCL12-Systems regelhaft beeinflusst und in 5T4⁺-Zellen CXCL12 die Migration und damit Metastasierung via CXCR4 stimuliert, wohingegen CXCL12 in 5T4⁻-Zellen die Proliferation und somit Tumorwachstum über CXCR7 fördert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Allgemeingültigkeit dieser These zu überprüfen und damit zu klären, inwieweit 5T4 ein verlässlicher Marker für die zelluläre Organisation des CXCL12-Systems darstellt. Als Untersuchungsgegenstand dienten die folgenden sechs humanen Tumorzelllinien:

- A549 (nichtkleinzelliges Lungenkarzinom)
- C-33A (Zervixkarzinom)
- DLD-1 (Kolorektales Karzinom)
- MDA-MB-231 (Mammakarzinom)
- PC-3 (Prostatakarzinom)
- H4 (Neurogliom)

Durch Western-Blot-Analysen zeigte sich, dass in allen genannten Zelllinien CXCR4 und CXCR7 exprimiert wird, wobei sich beide Rezeptoren sowohl in der FACS-Analyse als auch immunzytochemisch überwiegend intrazellulär mit meist nur geringen Anteilen in der Membran darstellten. Durch Verwendung des spezifischen CXCR4-Antagonisten AMD3100 sowie des spezifischen CXCR7-Antagonisten CCX771 konnte demonstriert werden, dass die CXCL12-Signaltransduktion in den meisten Tumorzelllinien sowohl von CXCR4 als auch von CXCR7 abhängig ist. Dies ist kompatibel mit der immer größere Anerkennung findenden These, dass beide CXCL12-Rezeptoren eine aktive Signaltransduktionseinheit bilden können und dabei entweder als Dimere vorliegen oder durch ‚downstream crosstalk‘ miteinander kommunizieren.

Im Gegensatz zum von Stern et al. beschriebenen Modell konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass 5T4 das CXCL12-System nicht generell beeinflusst, sondern vielmehr *per se* Chemotaxis und Proliferation von Tumorzellen modifiziert. So fördert die Expression von 5T4 allgemein Migration und inhibiert partiell die Proliferation von Tumorzellen. Diese Effekte gehen i.d.R. weder mit einer Veränderung der CXCL12-Rezeptorexpression noch mit einer alterierten Signaltransduktion oder veränderten

Rezeptorpräferenz einher und bestehen somit unabhängig vom CXCL12-System. Einzig DLD-1-Zellen zeigen nach 5T4-Knockout eine drastische Abnahme der CXCR7-Expression, einhergehend mit einem Verlust der zuvor in diesen Zellen beobachteten CXCL12-CXCR7-gesteuerten Migration. Interessanterweise wurde zusätzlich in A549 eine veränderte Zellmorphologie beobachtet, was wiederum mit einer Neuordnung von CXCR4 und CXCR7 hin zu einer Kolo-kalisation einherging. In Zusammenschau dieser Befunde kann 5T4 die Kriterien eines allgemeinen Parameters für die zelluläre Organisation des CXCL12-Systems nicht erfüllen und verliert somit seine Bedeutung als potentieller diagnostischer Marker.

7 Ausblick

In den westlichen Industrienationen verzeichnen Krebserkrankungen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die höchste Mortalität, wobei der dafür relevanteste Pathomechanismus die Bildung von Fernmetastasen ist. Eine gezielte Inhibition des SDF1-CXCR4-CXCR7-Signalweges hat das Potential, in Zukunft Metastasierungsprozesse zu unterbinden. Eine wesentliche Voraussetzung dafür wird sein, dass die individuelle Organisation des CXCL12-Systems für den jeweiligen Tumor bekannt ist. So gilt es umso mehr, alte Modelle des CXCL12-Systems aufzuweichen und das Verständnis darüber, wie komplex CXCR4 und CXCR7 miteinander interagieren, in die Entwicklung von Therapiekonzepten einfließen zu lassen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, kann 5T4 fakultativ das CXCL12-System in Tumorzellen beeinflussen, tut dies aber nicht generell. Insofern gilt es in Zukunft umso mehr, andere Einflussfaktoren für die Organisation des CXCL12-Systems ausfindig zu machen und diese Erkenntnisse in die Entwicklung diagnostischer und therapeutischer Strategien einfließen zu lassen.

8 Literaturverzeichnis

- Alam, S. M. K., S. Jasti, S. K. Kshirsagar, D. S. Tannetta, R. A. Dragovic, C. W. Redman, I. L. Sargent, H. C. Hodes, T. L. Nauser, T. Fortes, A. M. Filler, K. Behan, D. R. Martin, T. A. Fields, B. K. Petroff and M. G. Petroff (2018). "Trophoblast Glycoprotein (TPGB/5T4) in Human Placenta: Expression, Regulation, and Presence in Extracellular Microvesicles and Exosomes." *Reprod Sci* 25(2): 185-197.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy and E. A. Berger (1996). "CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." *Science* 272(5270): 1955-1958.
- Bachelierie, F., A. Ben-Baruch, A. M. Burkhardt, C. Combadiere, J. M. Farber, G. J. Graham, R. Horuk, A. H. Sparre-Ulrich, M. Locati, A. D. Luster, A. Mantovani, K. Matsushima, P. M. Murphy, R. Nibbs, H. Nomiyama, C. A. Power, A. E. Proudfoot, M. M. Rosenkilde, A. Rot, S. Sozzani, M. Thelen, O. Yoshie and A. Zlotnik (2014). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors." *Pharmacol Rev* 66(1): 1-79.
- Balabanian, K., B. Lagane, S. Infantino, K. Y. Chow, J. Harriague, B. Moepps, F. Arenzana-Seisdedos, M. Thelen and F. Bachelierie (2005). "The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes." *J Biol Chem* 280(42): 35760-35766.
- Beider, K., H. Bitner, M. Leiba, O. Gutwein, M. Koren-Michowitz, O. Ostrovsky, M. Abraham, H. Wald, E. Galun, A. Peled and A. Nagler (2014). "Multiple myeloma cells recruit tumor-supportive macrophages through the CXCR4/CXCL12 axis and promote their polarization toward the M2 phenotype." *Oncotarget* 5(22): 11283-11296.
- Bella, J., K. L. Hindle, P. A. McEwan and S. C. Lovell (2008). "The leucine-rich repeat structure." *Cell Mol Life Sci* 65(15): 2307-2333.
- Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski and T. A. Springer (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." *Nature* 382(6594): 829-833.
- Bonecchi, R. and G. J. Graham (2016). "Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the Inflammatory Response." *Front Immunol* 7: 224.
- Boyle, J. M., K. H. Grzeschik, P. R. Heath, J. E. Morten and P. L. Stern (1990). "Trophoblast glycoprotein recognised by monoclonal antibody 5T4 maps to human chromosome 6q14-q15." *Hum Genet* 84(5): 455-458.
- Brabletz, T. (2012). "To differentiate or not--routes towards metastasis." *Nat Rev Cancer* 12(6): 425-436.
- Burns, J. M., B. C. Summers, Y. Wang, A. Melikian, R. Berahovich, Z. Miao, M. E. Penfold, M. J. Sunshine, D. R. Littman, C. J. Kuo, K. Wei, B. E. McMaster, K. Wright, M. C. Howard and T. J. Schall (2006). "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." *J Exp Med* 203(9): 2201-2213.

Castro, F. V., O. J. McGinn, S. Krishnan, G. Marinov, J. Li, A. J. Rutkowski, E. Elkord, D. J. Burt, M. Holland, R. Vaghjani, A. Gallego, V. Saha and P. L. Stern (2012). "5T4 oncofetal antigen is expressed in high risk of relapse childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia and is associated with a more invasive and chemotactic phenotype." *Leukemia* 26(7): 1487-1498.

Charo, I. F. and R. M. Ransohoff (2006). "The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation." *N Engl J Med* 354(6): 610-621.

Chen K, Bao Z, Tang P, Gong W, Yoshimura T, Wang JM (2018). "Chemokines in homeostasis and diseases". *Cellular & Molecular Immunology* 15(4):324-334.

Chen, Q., & Zhong, T. (2015). "The association of CXCR4 expression with clinicopathological significance and potential drug target in prostate cancer: a meta-analysis and literature review." *Drug design, development and therapy* 9:5115-22.

Cheng, Y., Qu, J., Che, X., Xu, L., Song, N., Ma, Y., Gong, J., Qu, X., Liu, Y. (2017). "CXCL12/SDF-1 α induces migration via SRC-mediated CXCR4-EGFR cross-talk in gastric cancer cells." *Oncology letters* 14(2):2103-2110.

Chatterjee, S., B. Behnam Azad and S. Nimmagadda (2014). "The intricate role of CXCR4 in cancer." *Adv Cancer Res* 124: 31-82.

Chow, M. T., & Luster, A. D. (2014). "Chemokines in cancer". *Cancer immunology research* 2(12):1125-31.

Cooper, D. L., E. Medoff, N. Patel, J. Baker, K. Pratt, F. Foss, S. E. Seropian, S. Perreault and Y. Wu (2016). "Autologous Stem Cell Mobilization in the Age of Plerixafor." *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 16(7): 411-416.

DeVries, M. E., A. A. Kelvin, L. Xu, L. Ran, J. Robinson and D. J. Kelvin (2006). "Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system." *J Immunol* 176(1): 401-415.

Doitsidou, M., M. Reichman-Fried, J. Stebler, M. Kopranner, J. Dorries, D. Meyer, C. V. Esguerra, T. Leung and E. Raz (2002). "Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1." *Cell* 111(5): 647-659.

Feig, C., J. O. Jones, M. Kraman, R. J. Wells, A. Deonaraine, D. S. Chan, C. M. Connell, E. W. Roberts, Q. Zhao, O. L. Caballero, S. A. Teichmann, T. Janowitz, D. I. Jodrell, D. A. Tuveson and D. T. Fearon (2013). "Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(50): 20212-20217.

Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy and E. A. Berger (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." *Science* 272(5263): 872-877.

Firestein, G. S., & McInnes, I. B. (2017). "Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis." *Immunity* 46(2):183-196.

Gangadhar, T., Nandi, S., & Salgia, R. (2010). „The role of chemokine receptor CXCR4 in lung cancer.” *Cancer biology & therapy* 9(6):409-16.

Gold, P. and S. O. Freedman (1965). "DEMONSTRATION OF TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN HUMAN COLONIC CARCINOMATA BY IMMUNOLOGICAL TOLERANCE AND ABSORPTION TECHNIQUES." *J Exp Med* 121: 439-462.

Griffith, J. W., C. L. Sokol and A. D. Luster (2014). "Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity." *Annu Rev Immunol* 32: 659-702.

Guo, F., Y. Wang, J. Liu, S. C. Mok, F. Xue and W. Zhang (2016). "CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks." *Oncogene* 35(7): 816-826.

Guo, X., H. Zheng, W. Luo, Q. Zhang, J. Liu and K. Yao (2017). "5T4-specific chimeric antigen receptor modification promotes the immune efficacy of cytokine-induced killer cells against nasopharyngeal carcinoma stem cell-like cells." *Sci Rep* 7(1): 4859.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.

Hartmann, T. N., V. Grabovsky, R. Pasvolsky, Z. Shulman, E. C. Buss, A. Spiegel, A. Nagler, T. Lapidot, M. Thelen and R. Alon (2008). "A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells." *J Leukoc Biol* 84(4): 1130-1140.

Hawkins, R. E., M. Gore, Y. Shparyk, V. Bondar, O. Gladkov, T. Ganey, M. Harza, S. Polenkov, I. Bondarenko, P. Karlov, O. Karyakin, R. Khasanov, G. Hedlund, G. Forsberg, O. Nordle and T. Eisen (2016). "A Randomized Phase II/III Study of Naptumomab Estafenatox + IFNalpha versus IFNalpha in Renal Cell Carcinoma: Final Analysis with Baseline Biomarker Subgroup and Trend Analysis." *Clin Cancer Res* 22(13): 3172-3181.

Hernandez, L., M. A. Magalhaes, S. J. Coniglio, J. S. Condeelis and J. E. Segall (2011). "Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis." *Breast Cancer Res* 13(6): R128.

Hilger, D., M. Masureel and B. K. Kobilka (2018). "Structure and dynamics of GPCR signaling complexes." *Nat Struct Mol Biol* 25(1): 4-12.

Hole, N. and P. L. Stern (1988). "A 72 kD trophoblast glycoprotein defined by a monoclonal antibody." *Br J Cancer* 57(3): 239-246.

Hopman, R. K. and J. F. DiPersio (2014). "Advances in stem cell mobilization." *Blood Rev* 28(1): 31-40.

Hunger, C., V. Odemis and J. Engele (2012). "Expression and function of the SDF-1 chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 during mouse limb muscle development and regeneration." *Exp Cell Res* 318(17): 2178-2190.

- Janowski, M. (2009). "Functional diversity of SDF-1 splicing variants." *Cell Adh Migr* 3(3): 243-249.
- Kagermeier-Schenk, B., D. Wehner, G. Ozhan-Kizil, H. Yamamoto, J. Li, K. Kirchner, C. Hoffmann, P. Stern, A. Kikuchi, A. Schambony and G. Weidinger (2011). "Waif1/5T4 inhibits Wnt/beta-catenin signaling and activates noncanonical Wnt pathways by modifying LRP6 subcellular localization." *Dev Cell* 21(6): 1129-1143.
- Kawabata, K., M. Ujikawa, T. Egawa, H. Kawamoto, K. Tachibana, H. Iizasa, Y. Katsura, T. Kishimoto and T. Nagasawa (1999). "A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10): 5663-5667.
- Knaut, H., C. Werz, R. Geisler and C. Nusslein-Volhard (2003). "A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor." *Nature* 421(6920): 279-282.
- Lefort, S., Thuleau, A., Kieffer, Y., Sirven, P., Bieche, I., Marangoni, E., Vincent-Salomon, A., Mechta-Grigoriou, F. (2016). "CXCR4 inhibitors could benefit to HER2 but not to triple-negative breast cancer patients." *Oncogene* 36(9):1211-1222.
- Levoye, A., K. Balabanian, F. Baleux, F. Bachelierie and B. Lagane (2009). "CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling." *Blood* 113(24): 6085-6093.
- Liang, Z., Y. Yoon, J. Votaw, M. M. Goodman, L. Williams and H. Shim (2005). "Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis." *Cancer Res* 65(3): 967-971.
- Lipfert, J., V. Odemis, D. C. Wagner, J. Boltze and J. Engele (2013). "CXCR4 and CXCR7 form a functional receptor unit for SDF-1/CXCL12 in primary rodent microglia." *Neuropathol Appl Neurobiol* 39(6): 667-680.
- Luker, K. E., M. Gupta and G. D. Luker (2009). "Imaging chemokine receptor dimerization with firefly luciferase complementation." *Faseb j* 23(3): 823-834.
- Ma, L. and G. Pei (2007). "Beta-arrestin signaling and regulation of transcription." *J Cell Sci* 120(Pt 2): 213-218.
- Masyuk, M. and B. Brand-Saberi (2015). "Recruitment of skeletal muscle progenitors to secondary sites: a role for CXCR4/SDF-1 signalling in skeletal muscle development." *Results Probl Cell Differ* 56: 1-23.
- McGinn, O. J., S. Krishnan, J. P. Bourquin, P. Sapra, C. Dempsey, V. Saha and P. L. Stern (2017). "Targeting the 5T4 oncofetal glycoprotein with an antibody drug conjugate (A1mcMMAF) improves survival in patient-derived xenograft models of acute lymphoblastic leukemia." *Haematologica* 102(6): 1075-1084.
- McGinn, O. J., Marinov, G., Sawan, S., Stern P.L. (2012) "CXCL12 receptor preference, signal transduction, biological response and the expression of 5T4 oncofoetal glycoprotein." *J Cell Sci* 125: 5467-5478

Miller, M. C. and K. H. Mayo (2017). "Chemokines from a Structural Perspective." *Int J Mol Sci* 18(10).

Meng W, Xue S, Chen Y (2018). "The role of CXCL12 in tumor microenvironment." *Gene*. 641:105-110

Morse, M. A., D. Niedzwiecki, J. L. Marshall, C. Garrett, D. Z. Chang, M. Aklilu, T. S. Crocenzi, D. J. Cole, S. Dessureault, A. C. Hobeika, T. Osada, M. Onaitis, B. M. Clary, D. Hsu, G. R. Devi, A. Bulusu, R. P. Annechiarico, V. Chadaram, T. M. Clay and H. K. Lysterly (2013). "A randomized phase II study of immunization with dendritic cells modified with poxvectors encoding CEA and MUC1 compared with the same poxvectors plus GM-CSF for resected metastatic colorectal cancer." *Ann Surg* 258(6): 879-886.

Murray, M. J., R. A. Huddart and N. Coleman (2016). "The present and future of serum diagnostic tests for testicular germ cell tumours." *Nat Rev Urol* 13(12): 715-725.

Nagarsheth, N., Wicha, M. S., & Zou, W. (2017). "Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy." *Nature reviews Immunology* 17(9):559-572.

Nagasawa, T. (2015). "CXCL12/SDF-1 and CXCR4." *Front Immunol* 6: 301.

Nagasawa, T., S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani and T. Kishimoto (1996a). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." *Nature* 382(6592): 635-638.

Nagasawa, T., H. Kikutani and T. Kishimoto (1994). "Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(6): 2305-2309.

Nagasawa, T., T. Nakajima, K. Tachibana, H. Iizasa, C. C. Bleul, O. Yoshie, K. Matsushima, N. Yoshida, T. A. Springer and T. Kishimoto (1996b). "Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14726-14729.

Newby, D., G. Dalglish, F. Lyall and D. A. Aitken (2005). "Alphafetoprotein and alphafetoprotein receptor expression in the normal human placenta at term." *Placenta* 26(2-3): 190-200.

Nibbs, R. J. and G. J. Graham (2013). "Immune regulation by atypical chemokine receptors." *Nat Rev Immunol* 13(11): 815-829.

Oberlin, E., A. Amara, F. Bachelier, C. Bessia, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J. M. Heard, I. Clark-Lewis, D. F. Legler, M. Loetscher, M. Baggiolini and B. Moser (1996). "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." *Nature* 382(6594): 833-835.

Odemis, V., J. Lipfert, R. Kraft, P. Hajek, G. Abraham, K. Hattermann, R. Mentlein and J. Engele (2012). "The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells." *Glia* 60(3): 372-381.

Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, N. Mukaida and K. Matsushima (1991). "Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family." *Annu Rev Immunol* 9: 617-648.

Orimo, A., P. B. Gupta, D. C. Sgroi, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, R. Naeem, V. J. Carey, A. L. Richardson and R. A. Weinberg (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." *Cell* 121(3): 335-348.

Owens, G. L., V. E. Sheard, M. Kalaitzidou, D. Blount, Y. Lad, E. J. Cheadle, R. J. Edmondson, G. Kooner, D. E. Gilham and R. Harrop (2018). "Preclinical Assessment of CAR T-Cell Therapy Targeting the Tumor Antigen 5T4 in Ovarian Cancer." *J Immunother* 41(3): 130-140.

Petruzzello-Pellegrini, T. N., D. A. Yuen, A. V. Page, S. Patel, A. M. Soltyk, C. C. Matouk, D. K. Wong, P. J. Turgeon, J. E. Fish, J. J. Ho, B. M. Steer, V. Khajooee, J. Tigdi, W. L. Lee, D. G. Motto, A. Advani, R. E. Gilbert, S. A. Karumanchi, L. A. Robinson, P. I. Tarr, W. C. Liles, J. L. Brunton and P. A. Marsden (2012). "The CXCR4/CXCR7/SDF-1 pathway contributes to the pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome in humans and mice." *J Clin Invest* 122(2): 759-776.

Popple, A., L. G. Durrant, I. Spendlove, P. Rolland, I. V. Scott, S. Deen and J. M. Ramage (2012). "The chemokine, CXCL12, is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer." *Br J Cancer* 106(7): 1306-1313.

Porcile, C., A. Bajetto, F. Barbieri, S. Barbero, R. Bonavia, M. Biglieri, P. Pirani, T. Florio and G. Schettini (2005). "Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation." *Exp Cell Res* 308(2): 241-253.

Puchert, M., V. Adams, A. Linke and J. Engele (2016). "Evidence for the involvement of the CXCL12 system in the adaptation of skeletal muscles to physical exercise." *Cell Signal* 28(9): 1205-1215.

Puchert, M. and J. Engele (2014). "The peculiarities of the SDF-1/CXCL12 system: in some cells, CXCR4 and CXCR7 sing solos, in others, they sing duets." *Cell Tissue Res* 355(2): 239-253.

Puchert, M., F. Pelkner, G. Stein, D. N. Angelov, J. Boltze, D. C. Wagner, F. Odoardi, A. Flugel, W. J. Streit and J. Engele (2017). "Astrocytic expression of the CXCL12 receptor, CXCR7/ACKR3 is a hallmark of the diseased, but not developing CNS." *Mol Cell Neurosci* 85: 105-118.

Rajagopal, S., J. Kim, S. Ahn, S. Craig, C. M. Lam, N. P. Gerard, C. Gerard and R. J. Lefkowitz (2010). "Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(2): 628-632.

Saha, A., Ahn, S., Blando, J., Su, F., Kolonin, M. G., & DiGiovanni, J. (2017). "Proinflammatory CXCL12-CXCR4/CXCR7 Signaling Axis Drives Myc-Induced Prostate Cancer in Obese Mice." *Cancer research* 77(18):5158-5168.

Saito, G., S. Sadahiro, K. Okada, A. Tanaka, T. Suzuki and A. Kamijo (2016). "Relation between Carcinoembryonic Antigen Levels in Colon Cancer Tissue and Serum Carcinoembryonic Antigen Levels at Initial Surgery and Recurrence." *Oncology* 91(2): 85-89.

Salazar, N., D. Munoz, G. Kallifatidis, R. K. Singh, M. Jorda and B. L. Lokeshwar (2014). "The chemokine receptor CXCR7 interacts with EGFR to promote breast cancer cell proliferation." *Mol Cancer* 13: 198.

Samarendra, H., K. Jones, T. Petrinic, M. A. Silva, S. Reddy, Z. Soonawalla and A. Gordon-Weeks (2017). "A meta-analysis of CXCL12 expression for cancer prognosis." *Br J Cancer* 117(1): 124-135.

Schieving, J. H., M. de Vries, J. M. van Vugt, C. Weemaes, M. van Deuren, J. Nicolai, R. A. Wevers and M. A. Willemsen (2014). "Alpha-fetoprotein, a fascinating protein and biomarker in neurology." *Eur J Paediatr Neurol* 18(3): 243-248.

Scurr, M., T. Pembroke, A. Bloom, D. Roberts, A. Thomson, K. Smart, H. Bridgeman, R. Adams, A. Brewster, R. Jones, S. Gwynne, D. Blount, R. Harrop, M. Wright, R. Hills, A. Gallimore and A. Godkin (2017). "Effect of Modified Vaccinia Ankara-5T4 and Low-Dose Cyclophosphamide on Antitumor Immunity in Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial." *JAMA Oncol* 3(10): e172579.

Shakir M, Tang D, Zeh HJ, Tang SW, Anderson CJ, Bahary N, Lotze MT (2015). "The chemokine receptors CXCR4/CXCR7 and their primary heterodimeric ligands CXCL12 and CXCL12/high mobility group box 1 in pancreatic cancer growth and development: finding flow." *Pancreas* 44(4):528-34.

Sharma, P. and J. P. Allison (2015). "Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential." *Cell* 161(2): 205-214.

Shi J, Wei Y, Xia J, Wang S, Wu J, Chen F, Huang G, Chen J. (2014). "CXCL12-CXCR4 contributes to the implication of bone marrow in cancer metastasis." *Future Oncol.* 10(5):749-59.

Shibue, T. and R. A. Weinberg (2017). "EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications." *Nat Rev Clin Oncol* 14(10): 611-629.

Singh, A. K., R. K. Arya, A. K. Trivedi, S. Sanyal, R. Baral, O. Dormond, D. M. Briscoe and D. Datta (2013). "Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12." *Cytokine Growth Factor Rev* 24(1): 41-49.

Singh, R. K. and B. L. Lokeshwar (2011). "The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth." *Cancer Res* 71(9): 3268-3277.

Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2015). "The chemokine system in innate immunity." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7(5): a016303.

Spencer, H. L., A. M. Eastham, C. L. Merry, T. D. Southgate, F. Perez-Campo, F. Soncin, S. Ritson, R. Kemler, P. L. Stern and C. M. Ward (2007). "E-cadherin inhibits cell surface

localization of the pro-migratory 5T4 oncofetal antigen in mouse embryonic stem cells." *Mol Biol Cell* 18(8): 2838-2851.

Stacer, A. C., J. Fenner, S. P. Cavnar, A. Xiao, S. Zhao, S. L. Chang, A. Salomonsson, K. E. Luker and G. D. Luker (2016). "Endothelial CXCR7 regulates breast cancer metastasis." *Oncogene* 35(13): 1716-1724.

Stern, P. L., J. Brazzatti, S. Sawan and O. J. McGinn (2014). "Understanding and exploiting 5T4 oncofoetal glycoprotein expression." *Semin Cancer Biol* 29: 13-20.

Stern, P. L. and R. Harrop (2017). "5T4 oncofoetal antigen: an attractive target for immune intervention in cancer." *Cancer Immunol Immunother* 66(4): 415-426.

Tachibana, K., S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S. Nishikawa, T. Kishimoto and T. Nagasawa (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." *Nature* 393(6685): 591-594.

Terentiev AA, Moldogazieva NT (2013). "Alpha-fetoprotein: a renaissance." *Tumour Biol.* (4):2075-91

Thomas, R. M., J. Kim, M. P. Revelo-Penafiel, R. Angel, D. W. Dawson and A. M. Lowy (2008). "The chemokine receptor CXCR4 is expressed in pancreatic intraepithelial neoplasia." *Gut* 57(11): 1555-1560.

Turriziani, M., M. Fantini, M. Benvenuto, V. Izzi, L. Masuelli, P. Sacchetti, A. Modesti and R. Bei (2012). "Carcinoembryonic antigen (CEA)-based cancer vaccines: recent patents and antitumor effects from experimental models to clinical trials." *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 7(3): 265-296.

Voermans, C., E. C. Anthony, E. Mul, E. van der Schoot and P. Hordijk (2001). "SDF-1-induced actin polymerization and migration in human hematopoietic progenitor cells." *Exp Hematol* 29(12): 1456-1464.

Wang, J. and H. Knaut (2014). "Chemokine signaling in development and disease." *Development* 141(22): 4199-4205.

Wang, J., Y. Shiozawa, J. Wang, Y. Wang, Y. Jung, K. J. Pienta, R. Mehra, R. Loberg and R. S. Taichman (2008). "The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer." *J Biol Chem* 283(7): 4283-4294.

Wang, W., Y. Qiao and Z. Li (2018). "New Insights into Modes of GPCR Activation." *Trends Pharmacol Sci* 39(4): 367-386.

Yoshimura, T. (2015). "Discovery of IL-8/CXCL8 (The Story from Frederick)." *Front Immunol* 6: 278.

Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ (1987). "Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines." *Proc Natl Acad Sci* 84(24):9233-7.

Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ (1989). "Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants." *J Exp Med* 169(4):1449-59.

Zhao, Y., T. Malinauskas, K. Harlos and E. Y. Jones (2014). "Structural insights into the inhibition of Wnt signaling by cancer antigen 5T4/Wnt-activated inhibitory factor 1." *Structure* 22(4): 612-620.

Zlotnik, A., A. M. Burkhardt and B. Homey (2011). "Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis." *Nat Rev Immunol* 11(9): 597-606.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2012). "The chemokine superfamily revisited." *Immunity* 36(5): 705-716.

Zlotnik, A., O. Yoshie and H. Nomiya (2006). "The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution." *Genome Biol* 7(12): 243.

Zou, Y. R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi and D. R. Littman (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." *Nature* 393(6685): 595-599.

9 Anhang

9.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Datum

Unterschrift

9.2 Erklärung über den wissenschaftlichen Beitrag des Promovenden an der ausgewählten Publikation

Publikation:

Malte Puchert¹, Christian Koch¹, Jürgen Engele. **The 5T4 oncofetal antigen does not act as a general organizer of the CXCL12-system in cancer cells.** Experimental Cell Research (2018), doi: [10.1016/j.yexcr.2018.02.001](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.02.001)

¹geteilte Erstautorenschaft



Der vorliegenden Publikation ging eine Planungsphase voraus, in der Herr Prof. Dr. Jürgen Engele, Herr Dr. Malte Puchert und Herr Christian Koch die wissenschaftliche Zielsetzung und die Durchführung der Experimente gemeinsam erarbeiteten.

Für die genannte Publikation hat Herr Christian Koch folgende Methoden durchgeführt: Immunzytologische Färbungen, siRNA-Transfektion, Stimulationsexperimente in Zellkultur, Boyden-Chamber-Assay, MTT-Assay, Western-Blot-Analyse sowie FACS-Analyse. Die Experimente führte Herr Christian Koch nach Einarbeitung durch Herrn Dr. Malte Puchert und den technischen Assistenten Herrn Florian Kirmse selbstständig durch. An der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse, dem Erstellen der Statistiken sowie der Vorbereitung der Daten für die Publikation war er ebenfalls maßgeblich beteiligt. Die Angaben über den wissenschaftlichen Beitrag des Promovenden an der oben genannten Publikation können wir bestätigen. Eine geteilte Erstautorenschaft ist gerechtfertigt.

Prof. Dr. rer. biol. hum. Jürgen Engele

Dr. rer. nat. Malte Puchert

9.3 Teilnahmebescheinigung: Vorlesung zur guten wissenschaftlichen Praxis an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan	UNIVERSITÄT LEIPZIG Medizinische Fakultät		
Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Liebigstraße 27 b, 04103 Leipzig			
Kontakt: promotionsangelegenheiten@medizin.uni-leipzig.de			
Nachweisschein Für die Teilnahme an der Vorlesung zur "Guten Wissenschaftlichen Praxis" an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig			
Hiermit wird bestätigt, dass			
Herr / Frau	Christian Koch		
geb. am / in	09.07.1992 in Trier		
an der Vorlesung zur "Guten Wissenschaftlichen Praxis" an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig am 26.10. 2016 teilgenommen hat. Die Teilnahmebescheinigung ist bei Einreichung der Promotionsschrift im Referat für Akademische Angelegenheiten mit allen erforderlichen Unterlagen abzugeben. Alle Informationen zur Einreichung siehe unter: http://www.uniklinikum-leipzig.de/promotionsordnung-a-770.html			
Leipzig, den 26.10. 2016			
Im Auftrag des Dekans, Professor Dr. med. Michael Stumvoll			
<div style="text-align: center;"> Referat Akademische Angelegenheiten Medizinische Fakultät Universität Leipzig Liebigstraße 27 04103 Leipzig</div> <div style="text-align: center;"></div>			
<div style="text-align: center;">UNIVERSITÄT LEIPZIG Dekanat der Medizinischen Fakultät Referat Akademische Angelegenheiten Liebigstraße 27 b, 04103 Leipzig Tel. (0341) 97-15 822 • Fax (0341) 97-15 834</div>			
<div style="text-align: center;">FORSCHEN, LEHREN, HEILEN – AUS TRADITION FÜR INNOVATION</div> <table border="0" style="width: 100%;"><tr><td style="vertical-align: top;"><small>Mitglieder des Dekans: Professor Dr. Michael Stumvoll, Vorsitzender/Dekan Professor Dr. Ingo Bachmann, Prodekan Studien Professor Dr. Michael Schaefer, Prodekan Forschung Professor Dr. Jürgen Wellensieper, Studiendekan Humanmedizin Professor Dr. Holger Jänicke, Studiendekan Zahnmedizin Professor Dr. Anette Karling</small></td><td style="vertical-align: top;"><small>Sekretariat des Dekans: Telefon (0341) 97-15990 Telefax (0341) 97-15999 sekretat@medizin.uni-leipzig.de www.uni-leipzig.de/medizin</small></td></tr></table>		<small>Mitglieder des Dekans: Professor Dr. Michael Stumvoll, Vorsitzender/Dekan Professor Dr. Ingo Bachmann, Prodekan Studien Professor Dr. Michael Schaefer, Prodekan Forschung Professor Dr. Jürgen Wellensieper, Studiendekan Humanmedizin Professor Dr. Holger Jänicke, Studiendekan Zahnmedizin Professor Dr. Anette Karling</small>	<small>Sekretariat des Dekans: Telefon (0341) 97-15990 Telefax (0341) 97-15999 sekretat@medizin.uni-leipzig.de www.uni-leipzig.de/medizin</small>
<small>Mitglieder des Dekans: Professor Dr. Michael Stumvoll, Vorsitzender/Dekan Professor Dr. Ingo Bachmann, Prodekan Studien Professor Dr. Michael Schaefer, Prodekan Forschung Professor Dr. Jürgen Wellensieper, Studiendekan Humanmedizin Professor Dr. Holger Jänicke, Studiendekan Zahnmedizin Professor Dr. Anette Karling</small>	<small>Sekretariat des Dekans: Telefon (0341) 97-15990 Telefax (0341) 97-15999 sekretat@medizin.uni-leipzig.de www.uni-leipzig.de/medizin</small>		

9.4 Curriculum vitae

Persönliches

Name:	Christian Koch
Geburtsdatum und -ort:	09.07.1992 in Trier
Eltern:	Günter Koch (Einzelhandelskaufmann) Dagmar Koch, geb. Berg (Erzieherin)

Werdegang

03/2012	allgemeine Hochschulreife am Max-Planck-Gymnasium Trier
04-09/2012	Wehrdienst
seit 10/2012	Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig
08/2014	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2018	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
voraussichtlich 12/2019	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Förderungen und Ehrenamt

05/2015-04/2016	Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig
seit 07/2016	Stipendiat der Konrad-Adenauer-Stiftung
seit 2015	verschiedene politische Ehrenämter, u.a. mehrfach gewähltes Mitglied des erweiterten Senats der Universität Leipzig

9.5 Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

Publikation:

Malte Puchert¹, **Christian Koch¹**, Jürgen Engele. The 5T4 oncofetal antigen does not act as a general organizer of the CXCL12-system in cancer cells. Experimental Cell Research (2018), doi: [10.1016/j.yexcr.2018.02.001](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.02.001)

¹geteilte Erstautorenschaft

Posterpräsentationen:

Molecular Analysis for personalized Therapy Conference, Zürich 2017

C. Koch, M. Puchert, J. Engele

The 5T4 oncofetal glycoprotein does not act as a general organizer of the CXCL12 system in cancer cells

Abstract erschienen in Annals of Oncology
(<https://doi.org/10.1093/annonc/mdx511.012>)

14th Research Festival for Life Sciences Leipzig, 2018

C. Koch, M. Puchert, J. Engele

The 5T4 oncofetal glycoprotein does not act as a general organizer of the CXCL12 system in cancer cells

9.6 Danksagung

Mein allergrößter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Engele für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die exzellente Betreuung dieser Arbeit. Herr Dr. Malte Puchert verdient meine tiefste Dankbarkeit und Anerkennung für seine stetige Bereitschaft, mir in fachlichen wie menschlichen Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Ebenso gebührt mein Dank unserem technischen Assistenten, Herrn Florian Kirmse, der

mit seiner ruhigen und hilfsbereiten Art die Arbeit im Labor enorm erleichtert hat und wie die anderen Arbeitsgruppenmitglieder immer dazu beitrug, dass aus Arbeitszeit erfüllte Lebenszeit wurde. Das Institut für Anatomie wird mir auch in Zukunft am Herzen liegen und stets der Ort sein, an dem ich meine Begeisterung und Freude an der Wissenschaft entdeckt habe.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich aus tiefstem Herzen für Ihre Unterstützung, ihre Liebe und dafür, dass sie mein Leben mit Glück erfüllen. Am Herzen liegt mir ebenso das Max-Planck-Gymnasium Trier und einige ausgewählte Lehrer, denen ich für die mir zugekommene Hilfe in schwierigen Zeiten und die stetige Förderung meiner Talente zu allerhöchstem Dank verpflichtet bin und immer sein werde.

Der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig sowie der Konrad-Adenauer-Stiftung danke ich sehr für die finanzielle und ideelle Unterstützung und die mit beiden Stipendien verbundenen Privilegien, ohne die mir diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.

Die letzten Worte sollen dem großartigen Bertolt Brecht gehören, der die wirklich wichtigen Weisheiten des Lebens so einfach, eindrücklich und unterhaltsam wie kaum ein anderer zu Papier gebracht hat:

*Ja, renn nur nach dem Glück
Doch renne nicht zu sehr
Denn alle rennen nach dem Glück
Das Glück rennt hinterher.
Denn für dieses Leben
Ist der Mensch nicht anspruchslos genug.
Denn ist all sein Streben
Nur ein Selbstbetrug.*

Bertolt Brecht

Ballade von der Unzulänglichkeit menschlichen Strebens

Dreigroschenoper